

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Ingeniería Química



TESIS DOCTORAL

**Producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerina
(residuo de biodiésel)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Vanessa Ripoll Morales

Directores

Victoria E. Santos Mazorra

Miguel Ladero Galán

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



PRODUCCIÓN DE 2,3-BUTANODIOL

A PARTIR DE GLICERINA

Memoria que para optar al grado de doctor presenta

VANESSA RIPOLL MORALES

MADRID, 2016

La Dra. Victoria E. Santos Mazorra y el Dr. Miguel Ladero Galán, Profesores Titulares del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, afirman haber dirigido el trabajo recogido en la presente Memoria en el citado departamento, y que, a su juicio, reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentada como Tesis Doctoral.

Los Directores,

Dra. Victoria E. Santos Mazorra

Dr. Miguel Ladero Galán

AGRADECIMIENTOS

Ante todo quiero mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas sin las cuales esta tesis doctoral no habría sido posible.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis por abrirme la puerta al mundo de la investigación, dándome la oportunidad de realizar esta tesis. Gracias Vicky y Miguel por vuestro apoyo, paciencia y confianza en mí. Quiero dar gracias también al Dr. Félix García-Ochoa por su clarividencia y predisposición. Quiero agradecer al Dr. Emilio Gómez su incansable esfuerzo en hacer un poco más comprensible el mundo del oxígeno.

Quiero agradecer a Biopolis la colaboración en este proyecto. Gracias a Antonia Rojas y Marta Tortajada por el trabajo compartido, por encontrar estos “bichos” y el apoyo técnico en la distancia siempre que ha sido necesario.

Gracias a todos aquellos con los que, en algún momento, he compartido la cotidianidad del laboratorio, por las innumerables risas y momentos inolvidables, por hacer más llevadera esta ardua tarea de la investigación, incluso en los momentos más duros. Sin duda sin vosotros nada de esto habría sido posible. Por ser mucho más que compañeros de trabajo.

Gracias a todas aquellas que siempre confiaron en mí, que no dudaron en mi capacidad para llevar a cabo esta empresa y me apoyaron incesantemente, incluso en los momentos en los que ni yo misma veía su fin.

Somos prehistoria que tendrá el futuro,
somos los anales remotos del hombre.
Estos años son el pasado del cielo.

Al final del viaje está el horizonte,
al final del viaje partiremos de nuevo,
al final del viaje comienza un camino,
otro buen camino que seguir
descalzos contando la arena.
Al final del viaje estamos tú y yo intactos.
Quedamos los que puedan sonreír
en medio de la muerte, en plena luz.

Silvio Rodriguez (1970)

Si supiera qué es lo que estoy haciendo,
no lo llamaría investigación.

Albert Einstein

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	4
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL	11
1.2 GLICEROL: PROPIEDADES Y COMPOSICIÓN	13
1.3 INTEGRACIÓN EN LA BIORREFINERÍA: DE GLICEROL A PRODUCTOS DE MAYOR VALOR AÑADIDO	16
1.3.1 REVALORIZACIÓN QUÍMICA	17
1.3.2 REVALORIZACIÓN BIOTECNOLÓGICA	21
1.4 PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE 2,3-BUTANODIOL	29
1.4.1 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	30
1.4.2 APLICACIONES DEL 2,3-BUTANODIOL	31
1.4.3 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE 2,3-BUTANODIOL	32
1.4.4 SUSTRATOS EMPLEADOS	33
1.4.5 INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN	34
1.5 OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO	40
1.6 BIBLIOGRAFÍA	42
CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL	57
2.1 MATERIALES EMPLEADOS	59
2.1.1 MICROORGANISMOS	59

2.1.2	REACTIVOS	60
2.1.3	COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS EMPLEADOS	63
2.2	EQUIPOS	64
2.2.1	EQUIPOS REQUERIDOS PARA ASEGURAR LA ESTERILIDAD DE LOS MATERIALES	65
2.2.2	EQUIPOS REQUERIDOS PARA EL MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS	65
2.2.3	EQUIPOS DE MEDIDA Y ANÁLISIS	68
2.2.4	EQUIPOS AUXILIARES	70
2.3	PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	71
2.3.1	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA ALCANZAR CONDICIONES ESTÉRILES	71
2.3.2	CONSERVACIÓN DEL BIOCATALIZADOR	71
2.3.3	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA PRODUCCIÓN CON CÉLULAS EN ESTADO DE CRECIMIENTO	72
2.3.4	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA PRODUCCIÓN CON CÉLULAS EN <i>RESTING CELLS</i>	75
2.4	MÉTODOS DE ANÁLISIS	76
2.4.1	ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR	76
2.4.2	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL CALDO DE CULTIVO	77
2.5	MÉTODOS MATEMÁTICOS	79
2.5.1	DISEÑO DE EXPERIMENTOS TAGUCHI	80
2.5.2	MÉTODO DE ESTIMACIÓN DE $k_L \cdot a$	82
2.5.3	MÉTODOS MATEMÁTICOS DE AJUSTE	86
2.5	BIBLIOGRAFÍA	89

CAPÍTULO 3. SELECCIÓN DEL BIOCATALIZADOR DEL PROCESO **93**

3.1	ESTUDIOS PRELIMINARES	98
3.1.1	ESTUDIO PRELIMINAR DE LA INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE OXÍGENO EN LA RUTA METABÓLICA DE <i>RAOULTELLA</i> SPP.	98
3.1.2	ENSAYOS DE PRODUCCIÓN DE 2,3-BD EMPLEANDO DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO SINTÉTICOS	100
3.1.3	DESARROLLO DEL PROTOCOLO ESTANDARIZADO DE OBTENCIÓN DEL BIOCATAIZADOR EN LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BD	104
3.2	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN	107

3.3	COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LOS DISTINTOS BIOCATALIZADORES EMPLEANDO GLICERINA DE DISTINTA PROCEDENCIA COMO FUENTE DE CARBONO	114
3.4	BIBLIOGRAFÍA	118

CAPÍTULO 4. PRODUCCIÓN DE 2,3-BUTANODIOL

	CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO	123
4.1	PRODUCCIÓN DE 2,3-BD EN BIORREACTOR STBR: ESTUDIO PRELIMINAR DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN	127
4.2	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL pH EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE 2,3- BD EN BIORREACTOR STBR	131
4.2.1	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL pH: CONDICIONES CONTROLADAS Y EVOLUCIÓN LIBRE	135
4.2.2	DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA PARA LA MEJORA DE LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BD	140
4.3	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES HIDRODINÁMICAS EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE 2,3-BD EN BIORREACTOR STBR	142
4.3.1	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TRANSFERENCIA DE OXÍGENO	144
4.3.2	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL CONSUMO DE OXÍGENO	153
4.4	ESTUDIO DE LA FORMA DE OPERACIÓN DEL PROCESO	156
4.4.1	ESTUDIO DEL PROCESO EN <i>BATCH</i>	157
4.4.2	ESTUDIO DEL PROCESO EN FED-BATCH	163
4.5	DESARROLLO DEL PROCESO EMPLEANDO GLICEROL CRUDO COMO FUENTE DE CARBONO	166
4.6	COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTE ESTUDIO CON LOS RESULTADOS PUBLICADOS EN BIBLIOGRAFÍA	169
4.7	BIBLIOGRAFÍA	174

CAPÍTULO 5. PRODUCCIÓN DE 2,3-BUTANODIOL

	CON CÉLULAS EN ESTADO <i>DE RESTING CELLS</i>	183
5.1	DESARROLLO DE LA ETAPA DE OBTENCIÓN DEL BIOCATALIZADOR	187
5.1.1	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DEL BIOCATALIZADOR	187
5.1.2	DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DEL BIOCATALIZADOR	191
5.2	OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE BIOTRANSFORMACIÓN	192
5.2.1	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL pH	192

5.2.2	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOCATALIZADOR	197
5.2.3	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES HIDRODINÁMICAS	200
5.2.4	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE GLICERINA	206
5.2.5	COMPROBACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL PROCESO EMPLEANDO GLICEROL CRUDO COMO SUSTRATO	210
5.3	INFLUENCIA DEL ESTADO DEL BIOCATALIZADOR EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE 2,3-BD	212
5.4	BIBLIOGRAFÍA	219
CAPÍTULO 6. MODELO CINÉTICO DEL PROCESO		221
6.1	FORMULACIÓN DEL MODELO CINÉTICO	224
6.2	DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL MODELO CINÉTICO EN CRECIMIENTO	228
6.3	DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL MODELO CINÉTICO EN ESTADO DE <i>RESTING CELLS</i>	232
6.4	SIMULACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS EN <i>FED-BATCH</i> CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO	235
6.4	BIBLIOGRAFÍA	239
RESUMEN Y CONCLUSIONES		241
	RESUMEN	243
	CONCLUSIONES	248
NOMENCLATURA		257
ANEXOS		261
	ANEXO I. RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL CAPÍTULO 3	263
	ANEXO II. RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL CAPÍTULO 4	270
	ANEXO III. RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL CAPÍTULO 5	292

RESUMEN

Desde hace más de una década, la Unión Europea, a través de un marco legislativo, ha apostado por el desarrollo de la industria del biodiesel como alternativa sostenible al empleo de combustibles fósiles en el sector de los transportes. Como subproducto del proceso se genera glicerina en, aproximadamente, un 10% en masa respecto al biodiesel producido. Debido a la consecuente saturación del mercado de la glicerina, es necesaria la búsqueda de nuevas vías de revalorización de este residuo, con el fin de potenciar la integración en la biorrefinería y mejorar su rentabilidad económica.

La presente Tesis Doctoral "***Producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerina (residuo del biodiesel)***" profundiza en la revalorización biotecnológica del residuo para producir un compuesto de mayor valor añadido, el 2,3-butanodiol. Hasta el momento, este bioproceso ha sido escasamente estudiado, hecho que pone de manifiesto la justificación de esta investigación. La metodología empleada para el desarrollo del bioproceso comprende diferentes etapas, descritas a continuación.

- **Selección del biocatalizador.** Se ha estudiado la capacidad para producir 2,3-BD de dos cepas del género *Raoultella* en distintas condiciones, relacionadas tanto con las etapas previas de obtención del inóculo como con el medio de cultivo empleado y la temperatura de operación. Cabe destacar que estos biocatalizadores no han sido descritos previamente en bibliografía y que cumplen los requisitos en materia de seguridad biológica para su empleo a escala industrial. Se ha seleccionado *R. terrigena* CECT 4519 como la cepa más eficaz para ser empleada como biocatalizador en las etapas ulteriores.
- **Estudio del estado del biocatalizador.** La influencia del estado del biocatalizador en la biotransformación ha sido abordada empleando células en estado de crecimiento y células en estado de reposo o *resting cells*. Para cada uno de los biocatalizadores se ha

profundizado en la influencia de las condiciones y forma de operación para la determinación de los valores óptimos en cada caso.

- **Estudio de las condiciones de operación.** Fruto de la revisión del Estado del Arte se han identificado las variables de mayor influencia en la producción biotecnológica de 2,3-butanodiol. A saber pH y disponibilidad de oxígeno. Ambas variables son determinantes en la distribución de productos de la ruta metabólica.

En relación a la influencia del pH se ha determinado que la producción de 2,3-butanodiol está asociada a valores de pH ligeramente ácido, en el intervalo entre 5,0 y 6,0, independientemente del estado del biocatalizador empleado. Cuando se emplea un biocatalizador compuesto por células en estado de crecimiento, se ha desarrollado una estrategia de control de pH que maximiza la producción. Ésta consiste en una primera etapa de evolución libre desde pH neutro a pH 5,5 y el posterior mantenimiento en este valor. Para el caso de un biocatalizador compuesto por células en estado de *resting cells*, es posible desarrollar la operación a pH constante 5,5.

La influencia de la disponibilidad de oxígeno en el proceso ha sido estudiada a través de la velocidad de agitación, que determina el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno. El metabolismo fermentativo del 2,3-butanodiol está favorecido por condiciones microaerobias y su producción se maximiza cuando se emplea una velocidad de agitación de 325 rpm para las células en crecimiento y 400 rpm para células en estado de *resting cells*. En dichas condiciones, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y la demanda de consumo de oxígeno son, respectivamente, $3,57 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol}_{\text{O}_2}/(\text{L} \cdot \text{s})$ para células en crecimiento y $0,02 \text{ s}^{-1}$ y $4,24 \cdot 10^{-6} \text{ mol}_{\text{O}_2}/(\text{L} \cdot \text{s})$ para células en estado de *resting cells*. Estos parámetros son determinantes en una futura etapa de escalado del proceso.

- **Estudio de la forma de operación.** Para maximizar la producción de 2,3-butanodiol es necesario el estudio de la forma de operación óptima. A través de las conclusiones extraídas en el estudio de la operación en discontinuo (*batch*) empleando distintas concentraciones iniciales de glicerina, se determina la existencia de inhibición por sustrato para concentraciones iniciales superiores a 140 g/L cuando se emplean células en crecimiento. El desarrollo de la operación en semicontinuo (*fed-batch*) empleando diferentes perfiles de glicerina se ha llevado a cabo manteniendo siempre la concentración de sustrato en niveles inferiores a 140 g/L. Los resultados obtenidos

fueron exitosos en términos de concentración de 2,3-BD, rendimiento respecto al máximo teórico y productividad. El desarrollo de la operación empleando un biocatalizador compuesto por células en estado de *resting cells* elimina dicha problemática de inhibición por sustrato.

- **Empleo de glicerol crudo como sustrato.** Para ambos sistemas se ha comprobado la viabilidad de la operación empleando como sustrato muestras de glicerol recibidas de una industria de producción de biodiesel. Si bien su empleo conduce a pérdidas en la productividad respecto a la observada cuando se parte de glicerina pura, los valores obtenidos en términos de concentración de 2,3-BD y rendimiento respecto al máximo teórico son prácticamente iguales a los alcanzados con el sustrato puro.
- **Descripción cinética del proceso.** Se ha propuesto un modelo cinético de tipo empírico que tiene en cuenta el comportamiento del sistema observado en las etapas anteriores. Aplicando el método integral, se ha llevado a cabo la resolución de las ecuaciones diferenciales que definen la velocidad de producción de cada compuesto. El ajuste no lineal múltiple respuesta del modelo a los datos experimentales en *batch* ha conducido a la obtención del valor óptimo de los parámetros del mismo, empleando tanto células en crecimiento como en estado de *resting cells*. Se ha comprobado la validez del modelo propuesto a través de la simulación del proceso en *fed-batch* y mejorado dicha predicción mediante la hipótesis de variación del rendimiento de glicerol a 2,3-butanodiol durante el transcurso de la fermentación.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral son prometedores. A la vista de las conclusiones extraídas en la misma, se considera que la producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerol crudo es una vía potencial de revalorización de este residuo que puede contribuir al desarrollo de biorrefinerías integradas.

SUMMARY

For over a decade, biodiesel industry has been promoted by European policies as a sustainable alternative to fossil fuels in transport sector. As a derivative of this process, glycerin represents 10% (w/w) of the total biodiesel production. Due to the glycerin glut, it is necessary to find new paths to revalorize this waste. These processes can be integrated in bio-refineries, and thus it makes biodiesel industry not only economically more competitive, but also more environmentally sustainable.

This Dissertation "**2,3-butanediol production from glycerin (waste of biodiesel industry)**" gets into detail about biotechnological revalorization of the waste in order to produce a higher-value compound, 2,3-butanediol. Until now, this bioprocess had been barely studied. This fact shows the significance of this work. The methodology employed to develop the bioprocess comprises several stages, which are described below.

- **Biocatalyst selection.** Two novel strains belonging to *Raoultella* genus have been studied. These bacteria fulfill industrial-scale biosecurity requirements. Inoculum growth, operational temperature and culture medium have been tested in order to evaluate the efficiency of each microorganism to produce 2,3-butanediol. *R. terrigena* CECT 4519 has been selected as biocatalyst for the subsequent studies.
- **Biocatalyst state.** Regarding the state of the biocatalyst, there are two possibilities to produce 2,3-BD: the first one consists of using growing cells, while the second one consists of using resting cells. Due to its peculiarities, the influence of operational conditions and operation mode have been deeply studied for each biocatalyst state in order to determine optimal values for each one of them.
- **Operational conditions.** The starting point to study the operational conditions is the identification of the variables that have the deepest impact on the process. Resulting

from the State-of-Art review about biotechnological 2,3-butanediol production, pH and dissolved oxygen availability in the broth have been identified as key variables in the fermentation metabolism.

Regardless of the biocatalyst state, the production of the 2,3-butanediol is favored by slightly acid pH in the pH's range between 5.0 and 6.0. When growing cells are used, a strategy composed by two pH steps was defined in order to maximize the 2,3-butanediol production. Initially, a pH evolution without control from 7.0 to 5.5 is needed and then, a pH is monitoring at 5.5. When resting cells are used, a pH control at 5.5 is required, since the latter value is the optimal for 2,3-butanediol production.

A study of the oxygen availability in broth was carried out by means of varying stirring speed. This variable determines the volumetric oxygen transfer coefficient. Micro-aerobic conditions favors 2,3-butanediol production. It was found that the optimal stirring speed is 325 rpm using growing cells. In these conditions, volumetric oxygen transfer coefficient is $3.57 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ and oxygen's consumption is $6.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol}_{\text{O}_2}/(\text{L} \cdot \text{s})$. On the other hand, optimal stirring speed is 400 rpm when resting cells are used. In these conditions, volumetric oxygen transfer coefficient is 0.02 s^{-1} and oxygen's consumption is $4.24 \cdot 10^{-6} \text{ mol}_{\text{O}_2}/(\text{L} \cdot \text{s})$. Both parameters are essential for the scale-up of the process.

- **Operation mode.** The study of the operation mode is required to maximize 2,3-butanediol production. Regarding to batch process using growing cells, the results have shown that exists substrate inhibition when the initial glycerin concentration is over 140 g/L. For that reason, the implementation of the fed-batch strategy is of great interest. By contrast, the use of resting cells avoids the problem related to substrate inhibition, as can be deduced from the study of initial glycerin concentration in this system.
- **Raw glycerol as substrate.** Several samples of raw glycerol have been provided by a Spanish biodiesel manufacturing company in order to be tested as carbon substrate. Its use in the fermentation led to a lower productivity in comparison with pure glycerin, but reached 2,3-butanediol concentration and yield are similar to the ones obtained with the pure substrate.
- **Kinetic modelling.** From the knowledge acquired in the earlier studies regarding the metabolism, an empirical kinetic model has been proposed. A production rate equation

has been defined for each compound. In order to solve the differential equations system, it was necessary to apply the integral method. Parameter kinetic values have been determined through a non-linear multiple testing adjustments employing the software *Aspen Custom Modeler*®. Finally, a simulation was run for each compound evolution in fed-batch experiments, employing kinetic parameters calculated in batch. Due to the deviation in the glycerin profile predicted by the model comparing to the experimental points, a kinetic model that had in consideration the kinetic coefficient variation performance from glycerin to 2,3-butanediol, has been proposed as reflection of the metabolic flow transformation.

From a global point of view, the research developed in the current Thesis means a deepening in the enhancement of glycerol revalorization process towards 2,3-butanediol, barely studied until now. Thus, a new path for the biotransformation of raw glycerol into a value-added compound is consolidated. This work contributes to the bio-refinery integration through the production of a chemical compound with a wide range of uses: the 2,3-butanediol. The methodology approach employed for the development of this bioprocess has led to essential conclusions in order to create a solid starting point for the scale-up of the process.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El desarrollo tecnológico, científico, económico y social experimentado a partir de la Revolución Industrial ha dado lugar a cotas de confort inigualables e inimaginables antes del s. XVIII. Este punto de inflexión en la historia está directamente vinculado con el descubrimiento y empleo de las fuentes fósiles de energía (carbón y petróleo). Desde entonces, este explosivo desarrollo se ha traducido en un constante aumento de la demanda energética mundial.

Sin embargo, hoy en día son numerosas las evidencias que muestran la decadencia de la era del petróleo: el agotamiento progresivo de las reservas, que conlleva también las fluctuaciones en el precio del combustible, así como el deterioro del medioambiente derivado de su uso, siendo especialmente preocupante el papel que juegan los gases generados en la combustión en problemas ambientales de carácter global y la salud humana. En este contexto se hace patente la necesidad de encontrar y desarrollar fuentes de energía alternativas, más respetuosas con el medio ambiente, que puedan hacer frente a la imparable demanda energética mundial. Se abre así la puerta al concepto acuñado hace menos de una década como Tercera Revolución Industrial, que apuesta por el desarrollo de energías renovables como pieza clave para resolver el problema energético actual (Rifkin, 2008).

La reorientación del panorama energético hacia un horizonte más sostenible no puede pasar por alto la legislación del mercado de los combustibles destinados al transporte, uno de los principales sectores consumidores de energía. En este sentido, la Unión Europea, a través de la Directiva 2009/28/CE, ha establecido como compromiso comunitario el objetivo de que la

aportación de las energías procedentes de fuentes renovables al sector de los transportes sea del 10% al finalizar el año 2020. Se intensifican así las medidas en materia energética acordadas mediante la Directiva 2003/30/CE, a través de la cual se fijaba el contenido en biocombustible de la gasolina y el gasóleo comercializado para el transporte en 2% y 5,75% para el año 2005 y 2010, respectivamente.

Motivado por el marco legislativo, el biodiésel se erige dentro de Europa como biocombustible líder y su producción ha experimentado en los últimos años un crecimiento acorde a los esfuerzos gubernamentales de construcción de un futuro más sostenible en torno a las energías renovables. En la Figura 1.1 se muestra la evolución europea de la última década de producción de biodiésel. Como puede observarse, el crecimiento más fuerte se ha producido en torno a los años comprendidos entre 2005 y 2009, si bien a partir de este año la producción de biodiésel ha experimentado un crecimiento mucho más suave debido a estrategias de *dumping* llevadas a cabo por Argentina e Indonesia, que han generado conflictos internacionales con dichos países. Desde 2013, y por un periodo de 5 años, la Unión Europea ha puesto en marcha derechos *antidumping* sobre las importaciones de biodiésel originario de Argentina e Indonesia. Con esta medida se espera, además de restablecer una competencia leal, garantizar la reactivación del sector del biodiésel en el marco europeo a las cotas registradas años antes (Infinita renovables, 2015).

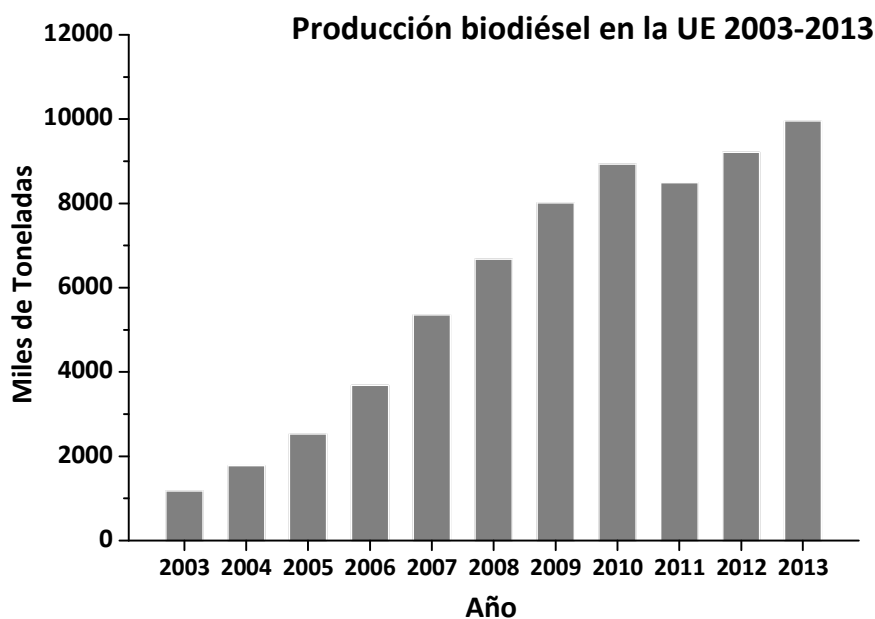


Figura 1.1 Evolución de la producción total europea de producción de biodiésel entre los años 2003 a 2013 (Infinita renovables, 2015).

1.1 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL

En los últimos años, tanto la academia como la industria están desarrollando un vasto trabajo para alcanzar mejoras tecnológicas que permitan optimizar el proceso de producción de biodiésel, cuyos costes de producción siguen siendo aún hoy en día el principal obstáculo para su comercialización. Si bien existen otros métodos de producción de biodiésel (formulación del biocombustible por mezcla directa de aceites vegetales, microemulsiones, pirólisis), la tecnología que está recibiendo mayor énfasis por sus exitosos resultados es la transesterificación de aceites vegetales y grasas animales (Abbaszaadeh y col., 2012, Atadashi y col., 2013).

La reacción de transesterificación de los triglicéridos presentes en aceites vegetal o grasas animales engloba la consecución de distintas reacciones reversibles, cuya reacción global puede ser esquematizada tal y como muestra la Figura 1.2. Atendiendo a la estequiometría de la reacción, una molécula de triglicérido reacciona con tres moléculas de alcohol para dar lugar a alquilésteres de ácidos grasos, cuya mezcla constituye el biodiésel, y glicerol.



Figura 1.2 Reacción global de transesterificación para la producción de biodiésel.

Atendiendo al origen de la materia prima empleada como fuente de triglicéridos se distingue entre biodiésel de primera, segunda y tercera generación. El biodiésel de primera generación emplea principalmente aceite extraído de semillas oleaginosas procedentes de cultivos agrícolas, tales como palma, girasol, maíz, soja, colza, caña de azúcar, etc. Este tipo de combustible requiere el empleo de suelo cultivable para usos energéticos, por tanto, es viable únicamente a corto plazo, ya que representa una amenaza para la seguridad alimentaria y la conservación de la biodiversidad y los recursos naturales, promoviendo el incremento de la deforestación y desertificación. Por este motivo, se espera que en unos años solo una mínima proporción de la producción total de biocombustibles sea de primera generación, siendo sustituida su producción por la de biodiésel de segunda y tercera generación por su mayor sostenibilidad.

El biodiésel de segunda generación es producido de materias primas como residuos agroindustriales, gramíneas forrajeras de alta producción de biomasa y desechos de madera. La diferencia fundamental del biodiésel de segunda generación respecto al de primera generación, es que se elabora a partir de materias primas que no se destinan a alimentación y se cultiva en terrenos no agrícolas o marginales, evitando así los monocultivos y la competencia con los cultivos alimentarios. Uno de los cultivos que más interés ha despertado es *Jatropha curcas*, caracterizado por su elevado contenido en aceite (50-60%) y su fácil crecimiento en áreas no cultivables y desérticas (Koh y Gazhi, 2011). Se estima que estos biocombustibles pueden dejar una huella de carbono mucho menor que la de los biocombustibles anteriores.

Actualmente se encuentran en desarrollo tecnologías destinadas a producir lípidos de composiciones similares a los aceites vegetales mediante bacterias, levaduras, hongos y algas. Esta alternativa es conocida como biocombustibles de tercera generación (Jimenez y col., 2014; Navarro y col., 2016).

En referencia al segundo reactivo presente en la transformación, son empleados alcoholes de cadena corta (C1 a C4), principalmente metanol y etanol, para evitar la formación de una emulsión estable entre la glicerina y el biodiésel al finalizar la reacción (Schuchardt y col., 1998; Demirbas, 2006; Marchetti y col., 2007).

Respecto a los catalizadores empleados en el proceso, cabe destacar que son muy diversos, pudiéndose clasificar en función de su naturaleza en catalizadores ácidos, básicos y enzimáticos. Existen además alternativas homogéneas y heterogéneas para los catalizadores de carácter ácido y básico. Cada uno de los cuales presenta ventajas y desventajas características, lo que no hace posible la elección de un grupo como mejor alternativa. En la Tabla 1.1 se han recogido un resumen de los catalizadores más frecuentes y las ventajas y desventajas asociados a cada uno de ellos (Tan y col., 2013).

Con independencia de la fuente de triglicéridos, el alcohol y el catalizador empleados, la cantidad de glicerol obtenida en el proceso de producción de biodiésel alcanza el 10% en términos máxicos, generándose 1 kg de glicerol por cada 10 kg de biodiésel producido. La formación de la glicerina como subproducto de la reacción juega un papel importante en el transcurso de la reacción, ya que constituye una fase inmiscible con el medio de reacción y, por tanto, desplaza el equilibrio hacia los productos.

Tabla 1.1 Ventajas y desventajas de los distintos catalizadores empleados en la reacción de transesterificación para la producción de biodiésel (Tan y col., 2013).

CATALIZADOR	TIPO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Básico	Homogéneo NaOH, KOH	<ul style="list-style-type: none"> - Reacción rápida - Condiciones suaves - Elevada conversión - Económico 	<ul style="list-style-type: none"> - Formación de jabón que reduce el rendimiento y dificulta la separación
	Heterogéneo CaO, MgO	<ul style="list-style-type: none"> - Reacción rápida - Condiciones suaves - Fácil separación - Reutilización/regeneración 	<ul style="list-style-type: none"> - Formación de jabón que reduce el rendimiento y dificulta la separación - Contaminación del producto
Ácido	Homogéneo H ₂ SO ₄ , HCl	<ul style="list-style-type: none"> - No reaccionan con ácidos grasos libres ni agua - Más económico que procesos básicos - 	<ul style="list-style-type: none"> - Reacción muy lenta - Alta temperatura y elevada relación molar de alcohol - Problemas de corrosión - Separación problemática
	Heterogéneo ZrO ₂ , TiO ₂ , SnO ₂ , zeolita	<ul style="list-style-type: none"> - No reaccionan con ácidos grasos libres ni agua - Una etapa de purificación - Reduce problema de corrosión - Fácil separación 	<ul style="list-style-type: none"> - Catalizadores costosos - Alta temperatura y elevada relación molar de alcohol - Tiempo de reacción largo - Contaminación del producto
Enzimas	Novozym 432 Lipozym IM 60	<ul style="list-style-type: none"> - No reaccionan con ácidos grasos libres ni agua - Condiciones muy suaves - Una etapa de purificación 	<ul style="list-style-type: none"> - Catalizadores costosos - Tiempo de reacción muy largo - Desactivación por sensibilidad al alcohol y a la glicerina

1.2 GLICEROL: PROPIEDADES Y COMPOSICIÓN

El glicerol o glicerina son términos utilizados para referirse al 1,2,3-propanotriol. En la presente Tesis Doctoral ambos términos serán utilizados indistintamente. Se trata de una molécula con tres grupos funcionales hidroxilo, cuya naturaleza hidrofílica es la responsable de su total solubilidad en agua y alcoholes así como su tendencia higroscópica. A temperatura ambiente se presenta como líquido incoloro e inodoro de elevada viscosidad. En la Tabla 1.2 se han recogido sus principales propiedades físicas. Su carácter inocuo tanto para el ser humano como para el medioambiente hace del glicerol un producto versátil de gran interés en procesos de química verde.

A lo largo de la Historia, el desarrollo e importancia de otras industrias han marcado la evolución de la producción de glicerol. Tradicionalmente su obtención ha estado asociada a la industria del jabón, donde la glicerina se genera en la reacción de saponificación de aceites vegetales empleada para producir los carboxilatos que constituyen el jabón. A partir de la segunda mitad del s. XX, la creciente demanda de glicerol unida al auge de la industria petroquímica, potenciaron el desarrollo de procesos de producción de glicerol a partir de

derivados del petróleo. Surgen así dos vías de obtención a partir de óxido de propileno: vía epiclorhidrina y vía alcohol alílico. La eficacia de ambas es elevada, pero su principal desventaja está relacionada con el empleo de recursos fósiles. Si bien estos procesos han representado gran importancia durante décadas, la tendencia actual es la sustitución de estas rutas por aquellas que impliquen el uso de fuentes de origen renovable (Ayoub y Abdullah, 2012).

Desde principios del s. XXI, debido al ya comentado auge de los biocombustibles, la producción de glicerol aparece vinculada al proceso de producción de biodiésel, industria en la que se genera como residuo, habiendo llegando a desplazar al resto de vías de obtención. La producción de glicerol ha experimentado por tanto un crecimiento acorde a la tendencia observada para el biodiésel, tal y como muestra la Figura 1.3.

Tabla 1.2 *Propiedades físicas del glicerol, a 25 °C y 101,3 kP (Tan y col., 2013).*

PROPIEDAD	VALOR
Peso molecular (g/mol)	92,09
Densidad (g/mL)	1,264
Punto de ebullición (°C)	290
Punto de fusión (°C)	17,9
Viscosidad (Pa·s)	1,5
Tensión superficial (mN/m)	64

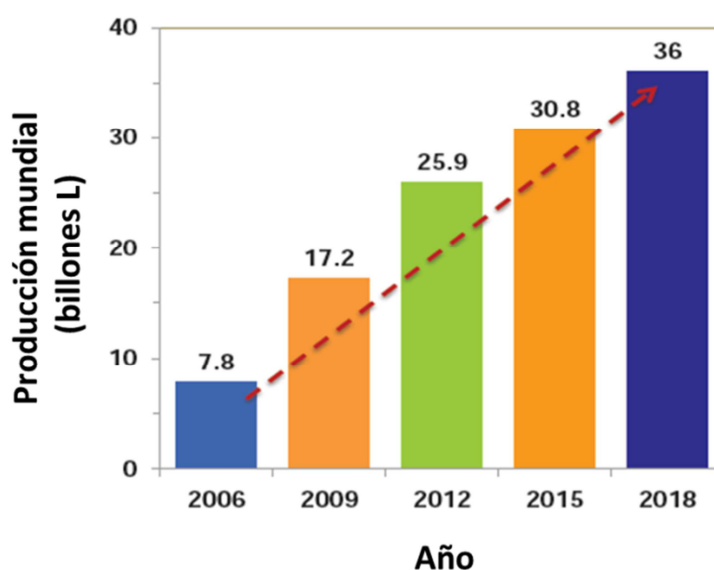


Figura 1.3 *Evolución de la producción mundial de biodiésel y proyección para el año 2018 (Nanda y col., 2014).*

Sin embargo, la fracción de glicerol obtenida directamente de la reacción de transesterificación (denominada glicerol crudo) presenta impurezas solubles en ésta que modifican sus propiedades respecto al producto puro. Si bien la composición del glicerol crudo es variable, en función del tipo de proceso que lo originó y las materias primas empleadas en el mismo, se puede generalizar diciendo que las principales impurezas que puede contener son alcohol, jabón, agua, sales inorgánicas procedentes del catalizadores homogéneos; mono-, di- y triglicéridos; y cenizas. La presencia de estas impurezas pueden implicar problemas en su posterior reutilización, tales como la acumulación de depósitos sólidos en el reactor, la desactivación del catalizador y la inhibición de la actividad enzimática o microbiana en el caso de biocatalizadores (Sarma y col., 2012; Nanda y col., 2014). Diversos autores se han centrado en el estudio del proceso posterior de refinado del glicerol crudo para su purificación, basados en operaciones de neutralización, filtración, centrifugación, destilación, destilación a vacío, intercambio iónico y adsorción (Kongjao y col., 2010; Hidawati y Sakinah, 2011; Tan y col., 2013; Ardi y col., 2015).

El glicerol es un compuesto con cientos de aplicaciones directas a nivel industrial. En la Figura 1.4 se recogen el desglose de los usos tradicionales más significativos. El principal consumidor de glicerol es la industria de cosméticos, que incluye productos de higiene personal, empleado en la formulación de dentífricos, lociones y cremas para la piel. Dentro de la industria farmacéutica se incluye como excipiente en analgésicos, jarabes para la tos, tranquilizantes y vasodilatadores. La industria alimentaria es otra gran demandante de este compuesto, debido a su carácter no tóxico para la salud humana y las propiedades físicas características como la higroscopicidad y elevada viscosidad y ligero sabor dulce. Se emplea como agente humectante en siropes y como disolvente para dar consistencia a productos aromatizantes y colorantes.

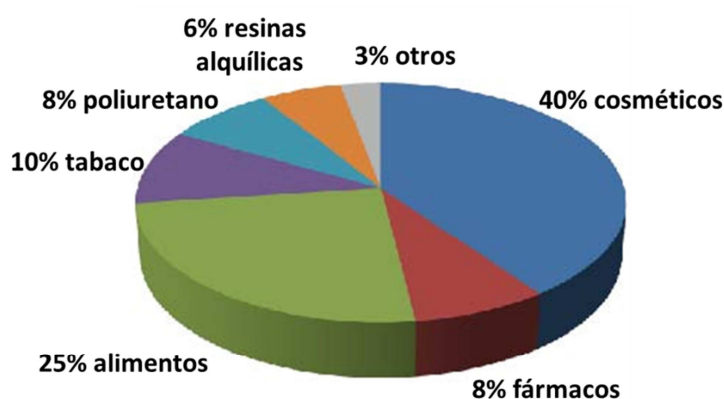


Figura 1.4 Usos tradicionales del glicerol: desglose de las aplicaciones a nivel mundial (Stelmachowski, 2011).

Estas industrias abarcan casi tres cuartas partes del mercado convencional del glicerol y requieren una elevada pureza para estas finalidades. Por tanto, el uso de glicerol crudo procedente del proceso de producción de biodiésel no es válido para tales aplicaciones y requieren necesariamente el proceso de refinado posterior, encareciendo así el proceso.

1.3 INTEGRACIÓN EN LA BIORREFINERÍA: DE GLICEROL A PRODUCTOS DE MAYOR VALOR AÑADIDO

El concepto de biorrefinería integrada, análogo al de refinería convencional, se basa en desarrollar tecnologías que permitan el aprovechamiento completo de la biomasa empleada como materia prima en una única instalación, dando lugar a una gran variedad de productos que incluyen energía, biocombustibles, productos químicos de alto valor añadido y biomateriales. Con este planteamiento se potencia la eficiencia y sostenibilidad de las biorrefinerías, buscando nuevas vías de aprovechamiento de los residuos generados en el proceso (Genoma España, 2009).

En la actualidad, en torno al 85% de los productos químicos se obtienen a partir de 20 productos químicos base o *building blocks*. De estos 20 productos, 8 proceden de la industria petroquímica, a partir de los cuales se producen más de 300 compuestos intermedios que a su vez pueden transformarse en alrededor de 30.000 productos finales. Utilizando conceptos similares a los empleados por la industria petroquímica, el Departamento Americano de Energía (DOE) ha identificado 12 compuestos base que pueden obtenerse a partir de biomasa, entre las cuales se encuentra el glicerol, gracias a la versatilidad de productos a los que puede dar lugar (Werpy y Petersen, 2004).

Históricamente, debido a su elevado precio, el glicerol ha sido empleado principalmente en aplicaciones directas o indirectas de valor añadido medio o alto. Sin embargo, el aumento de la producción de biodiésel ha conllevado que el volumen de glicerol producido derivado de dicha industria haya saturado el mercado para sus usos habituales. Por ello, la comunidad científica ha realizado en las últimas décadas un gran esfuerzo en desarrollar nuevos procesos de revalorización del glicerol, debido al bajo coste del residuo y al fuerte impacto que tienen estos procesos en la economía global de la industria del biodiésel.

Sus características químicas así como su similar estructura a los azúcares le confieren una reactividad química interesante y una importancia biológica, siendo posible ser transformado a través de distintos procesos químicos y biotecnológicos, que permitirán la síntesis de un elevado número de productos de interés industrial. A continuación se describen

las principales rutas de revalorización del glicerol, clasificadas en procesos químicos y procesos biotecnológicos.

1.3.1 REVALORIZACIÓN QUÍMICA

El gran interés desde el punto de vista químico de la molécula de glicerol deriva de su estructura molecular. La presencia de dos grupos funcionales (alcohol primario y alcohol secundario) le confieren una reactividad característica que le permite la formación de muy diversos derivados. En la Figura 1.5 se muestran las principales rutas de aprovechamiento del glicerol por vía química. Se puede observar la enorme diversidad de los procesos de revalorización del glicerol. A continuación se describen algunas de las principales rutas así como el interés de los productos obtenidos a través de ellas.

OXIDACIÓN SELECTIVA

La oxidación selectiva del glicerol tiene lugar mediante un complejo esquema de reacción que conduce a un elevado número de productos entre los que destacan la dihidroxiacetona, el ácido glicérico, el ácido hidroxipirúvico, el ácido mesoxálico y el ácido hidroxietanoico. Estos productos, especialmente los dos últimos, son agentes quelantes potencialmente muy útiles como intermedios para la síntesis de compuestos de química fina y novedosos polímeros.

Gracias a la estructura molecular del glicerol, la oxidación selectiva puede llevarse a cabo mediante catálisis heterogénea, empleando agentes oxidantes baratos y limpios, como aire, oxígeno y peróxido de hidrógeno. Sin embargo, la etapa limitante para la implementación de un proceso industrial de estas características es el diseño de un catalizador heterogéneo económico que controle la quimioselectividad de la reacción de oxidación del glicerol del alcohol primario y que resista los procesos de desactivación por oxidación. Hasta ahora, los mejores resultados se han obtenido empleando catalizadores basados en oro, platino y paladio (Bagheri y col., 2015; Chan-Thaw y col., 2015).

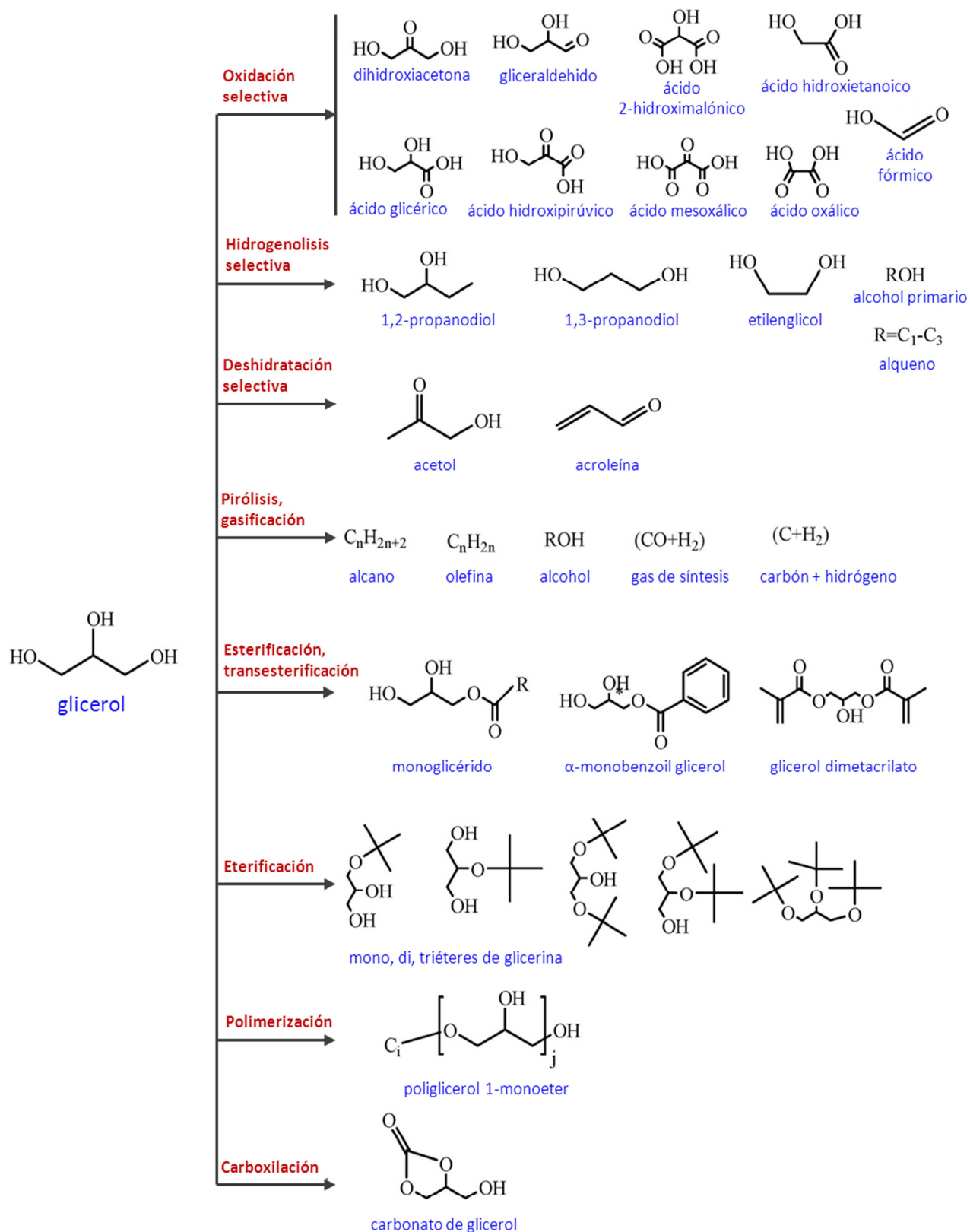


Figura 1.5 Principales rutas de revalorización del glicerol por vía química (Zhou y col., 2008).

HIDROGENOLISIS SELECTIVA

La reacción general de hidrogenolisis de glicerol consiste en la eliminación selectiva de uno de los grupos hidroxilo de la estructura de la molécula. Los principales productos de esta síntesis son propanodiolos, de gran interés industrial. El 1,2-propanodiol se emplea como aditivo en productos nutricionales (como disolvente de colorantes y saborizantes), en cosméticos, y como parte de la formulación de lubricantes y anticongelantes o como humectante en tabaco (Zhou y col., 2008). El 1,3-propanodiol es considerado un compuesto químico base o *platform chemical* debido al elevado número de aplicaciones que presenta en diversas industrias, como la de polímeros, cosméticos, cuidado personal y limpieza. El 1,3-PD es empleado principalmente como monómero para la producción del polímero tereftalato de polítrimetileno (PTT), sintetizado por policondensación de ácido tereftálico (Rodríguez y col., 2015). El PTT es un polímero termoplástico que presenta ventajas respecto al nylon, como su mayor suavidad que proporciona una gran sensación de confort y comodidad, su resistencia natural a las manchas y su gran recuperación después de someterlo a fuerzas de estiramiento. Por ello, las aplicaciones de este material se enmarcan en la industria textil, para la fabricación de lencería, trajes de baño, ropa deportiva, abrigos y alfombras.

Tradicionalmente el 1,2-propanodiol y el 1,3-propanodiol se sintetizan a partir de óxido de propileno y óxido de etileno, respectivamente, mediante procesos bastante costosos en términos económicos y de generación de residuos. Por ello, la síntesis a partir de glicerol se presenta como alternativa a los métodos tradicionales. Se requieren altas temperaturas y catalizadores heterogéneos de carácter metálico: cobre y zinc para el caso del 1,2-propanodiol y rutenio y renio para el caso del 1,3-propanodiol (Pagliaro y col., 2007).

DESHIDRATACIÓN SELECTIVA

El principal producto de la deshidratación selectiva es la acroleína, compuesto intermedio empleado en la síntesis de ácido acrílico, cuya principal aplicación es la fabricación de polímeros, como el poliacrilato sódico, conocido por sus singulares características absorbentes, pudiendo absorber el equivalente en líquido de más de 500 veces su peso. Por ello, es empleado en la fabricación de pañales, toallas higiénicas y también en procesos químicos que requieran la absorción de agua, como la industria papelera. La síntesis tradicional de acroleína es la oxidación parcial de propileno, materia prima derivada del petróleo. La posibilidad de sintetizar este compuesto a partir de glicerol, constituye una alternativa sostenible para la producción de monómeros a partir de recursos renovables (Estevez y col., 2015).

La reacción de deshidratación del glicerol para producir acroleína puede tener lugar en fase gas o en fase líquida y se emplean distintos catalizadores. Aunque actualmente la catálisis homogénea ácida es la más empleada, se está estudiando la posibilidad de emplear catalizadores heterogéneos, como heteropoliácidos, zeolitas y óxidos metálicos, que reducen la contaminación, la corrosión de los equipos y los costes de producción respecto al uso de ácido sulfúrico como catalizador (Talebian-Kiakalaieh y col., 2014).

REACCIONES DE ESTERIFICACIÓN Y TRANSESTERIFICACIÓN

Los mono- y diglicéridos son compuestos que presentan amplias aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, debido a su peculiar estructura con una cabeza hidrófila y una cola hidrófoba. Destacan su uso como emulsionantes y lubricantes alimentarios, excipientes para principios activos de fármacos de naturaleza liposoluble, diluyentes de perfumes, agentes en la formulación de champús y filtros de protección en cremas solares (Molinero y col., 2014).

Los mono- y diglicéridos son sintetizados a través de reacciones de esterificación con metilésteres de ácidos grasos o esterificación de ácidos grasos con glicerina. Sin embargo, los tres grupos hidroxilo presentes en la estructura de la glicerina presentan prácticamente la misma reactividad, obteniéndose como producto de la reacción una mezcla de monoglicéridos (40-60%), diglicéridos (35-45%) y triglicéridos. Para reducir la temperatura de reacción se emplean catalizadores ácidos (ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácidos organosulfónicos) en la reacción de esterificación y catalizadores básicos (hidróxido sódico e hidróxido cálcico) en la reacción de transesterificación. Entre los catalizadores heterogéneos más empleados destacan los óxidos metálicos y sales soportados en materiales mesoporosos (Zhou y col., 2008; Teng y col., 2014).

REACCIONES DE ETERIFICACIÓN

Los éteres de glicerina presentan grandes aplicaciones como aditivos oxigenados en la formulación de combustibles como diésel y biodiésel. En particular, una mezcla de 1,3-di-, 1,2-di- y 1,2,3-tri-*terc*-butil glicerol (GTBE), incorporados en una proporción del 30-40% al diésel, reducen significativamente las emisiones de partículas sólidas, hidrocarburos, monóxido de carbono y aldehídos (Pagliaro y col., 2007).

Los alquiléteres de glicerol pueden sintetizarse por la adición de un alqueno al glicerol o bien por la condensación de esta molécula y un alcohol alifático con eliminación de agua. Para ambos procesos se emplean catalizadores ácidos como ácido sulfónico, resina Amberlyst

distintos tipos de zeolitas (Leoneti y col., 2012; Bagheri y col., 2015). Si bien la adición de isobuteno para sintetizar GTBE es la ruta más empleada. Las condiciones de operación requeridas son suaves (70-110 °C, 20-30 bar) y la relación molar glicerol: isobuteno requerida es 1:2. La mezcla de reacción está constituida por dos fases inmiscibles, separadas entre sí por las diferencias de polaridad: fase polar de glicerol y fase apolar de isobuteno. El producto obtenido es fácilmente purificado y la mezcla de materia prima no reaccionada y el catalizador es recirculado al tanque de reacción (Behr y Gomes, 2010).

REACCIÓN DE CARBOXILACIÓN

El carbonato de glicerina constituye el principal producto de la reacción de carboxilación de la glicerina. Esta molécula tiene numerosas aplicaciones potenciales como compuesto intermedio, tales como compuesto agregado al cemento, disolvente, surfactante, agente transportador en cosméticos y fármacos aplicados por vía tópica, disolvente en baterías de litio e ion-litio o como transportador de electrolitos (Okoye y Hameed, 2016).

La síntesis de carbonato de glicerina se puede llevar a cabo a través de diversas rutas, como son la fosfogenación, la adición de monóxido o dióxido de carbono y la glicerolisis de urea. Sin embargo, es la transesterificación de glicerina con carbonatos orgánicos la que más interés ha despertado en los últimos años, debido a las temperaturas de operación moderadas en un medio de reacción exclusivamente líquido (Esteban y col., 2014).

1.3.2 REVALORIZACIÓN BIOTECNOLÓGICA

La biotecnología, y más concretamente la biocatálisis, ocupa en la actualidad un lugar relevante dentro de los procesos de síntesis de compuestos químicos de interés industrial. Se entiende por biocatálisis aquellos procesos productivos que emplean tanto organismos completos como sistemas enzimáticos aislados, ya sean libres o inmovilizados. El empleo de biocatalizadores constituye una alternativa sostenible frente a la síntesis química tradicional, ya que emplea condiciones de reacción más suaves y, por tanto, tiene menores requerimientos energéticos. Además, los biocatalizadores son biodegradables y tienen elevada selectividad química, por lo que disminuye la formación de subproductos y la necesidad de activación, desactivación y/o protección de grupos funcionales de los reactivos.

La revalorización biotecnológica del glicerol abre las puertas al desarrollo de nuevos bioprocesos, interesantes desde el punto de vista económico, debido a la disponibilidad y al reducido precio de este sustrato, así como por las peculiaridades bioquímicas de esta molécula, determinadas por el menor peso molecular y mayor grado de reducción que azúcares, como la

glucosa y la xilosa, cuyo uso está ampliamente extendido en las biotransformaciones. Estas ventajas han desembocado en un interés creciente en los procesos enfocados en la transformación microbiana del glicerol en compuestos químicos de alto valor añadido.

Son numerosos los microorganismos que presentan la capacidad de emplear el glicerol como sustrato carbonado para el crecimiento y mantenimiento celular. Entre ellos destacan diversos géneros bacterianos pertenecientes a la familia de las Enterobacterias, como *Escherichia*, *Klebsiella* y *Citrobacter*. Asimismo otros géneros como *Clostridium*, *Gluconobacter* y *Propionibacterium* también presentan esta capacidad. Dentro de las especies fúngicas destacan algunas levaduras como *Saccharomyces*, *Candida* y *Yarrowia*. (Deppenmeier y col., 2002; Li y col., 2013). Además es posible mediante técnicas de ingeniería genética (sobreexpresión, delección y/o introducción de genes de interés) e ingeniería fisiológica (cultivo y adaptación de los catalizadores a las condiciones apropiadas del proceso) desarrollar y optimizar nuevas cepas que constituyan biocatalizadores más eficientes.

Para profundizar en la comprensión del papel del glicerol dentro de la biología celular y los productos que pueden ser obtenidos, son numerosos los estudios desarrollados en torno a la profundización en el transporte del glicerol al interior de la célula así como en las rutas catabólicas y su regulación en distintas especies bacterianas y hongos (Muraka y col., 2008; da Silva y col., 2009; Fakas y col., 2009; Martinez-Gomez y col., 2012; Schindler y col., 2014; Wang y col., 2014; Papanikolau y col., 2016).

Debido al bajo peso molecular del glicerol, éste puede ser transportado al interior de la célula mediante transporte pasivo: difusión pasiva y difusión facilitada. Ambos mecanismos se llevan a cabo a sin consumo energético y únicamente es posible cuando la fuerza impulsora, marcada por la diferencia de la concentración entre el exterior y el interior del medio celular, es suficientemente grande. Mientras que la difusión pasiva tiene lugar por la penetración directa de la molécula a través de la bicapa lipídica, la difusión facilitada requiere proteínas integradas en la membrana plasmática a través de las cuales tiene lugar el flujo de moléculas. Entre las proteínas integrales destacan las acuagliceroporinas, que pertenecen a la familia de las acuaporinas y permiten el transporte de agua principalmente, pero también de otros solutos sin carga de pequeño tamaño, entre los que se incluye el glicerol (Boury-Jamot y col., 2006).

Generalmente el transporte de sustratos por difusión es poco frecuente debido a que normalmente la concentración de éstos en el ambiente es baja. Sin embargo, el glicerol es uno de las pocas excepciones. Para mantener el gradiente de concentración, la estrategia bacteriana

consiste en la transformación rápida a otros sustratos, permitiendo así que el transporte de glicerol desde el exterior al interior celular no cese. La estrategia más empleada es el acoplamiento del transporte de glicerol con la fosforilación mediante la acción de la enzima glicerol quinasa, transformándose en glicerol-3-fosfato al entrar en la célula (Fakas y col., 2009).

En las especies fúngicas el transporte activo de glicerol tiene mayor importancia que los fenómenos de difusión. El transporte de este sustrato está ligado al simporte de protones a través de permeasas, que permiten la entrada simultánea de protones y glicerol al interior celular, con el consiguiente gasto energético. Este mecanismo permite que la concentración de glicerol en el medio celular sea diez veces mayor que en el exterior debido al gradiente positivo que existe para la concentración de iones H^+ . Por tanto, para estos microorganismos la disponibilidad de glicerol está fuertemente ligada al pH (Lages y Lucas, 1997; Zeuthen y Klaerke, 1999; Yu y col., 2010).

Una vez transportado al interior de la célula, el glicerol puede ser catabolizado a través de diferentes rutas metabólicas, que dan lugar a una amplia gama de metabolitos, como se ha esquematizado en la Figura 1.6. El alto grado de reducción de la molécula de glicerol respecto a otros carbohidratos más oxidados empleados como sustratos, como la glucosa y la xilosa, presenta una ventaja comparativa para la obtención de compuestos químicos reducidos, como los dioles 1,2-propanodiol y 1,3-propanodiol, a través de procesos fermentativos anaerobios, debido al mayor rendimiento teórico de esta fuente de carbono frente a los citados azúcares (Clomburg y Gonzalez, 2013). Por otro lado, las principales rutas involucradas en el metabolismo aerobio del glicerol son la fosforilación y la ruta oxidativa. Ambas conducen a la síntesis de intermediarios de la ruta de glucolisis y posterior transformación a piruvato e incorporación al ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs, a través del cual se pueden sintetizar una amplia gama de productos de diferente naturaleza (Fakas y col., 2009; Matta, y col., 2013). Así mismo, el piruvato constituye el metabolito central del metabolismo fermentativo de muchas especies, dando lugar a compuestos orgánicos de naturaleza ácida, como el ácido láctico y acético, y alcoholes, como el etanol y el 2,3-butanodiol (Murarka y col., 2007; da Silva y col., 2009; Almeida y col., 2012; Mattam y col., 2013).

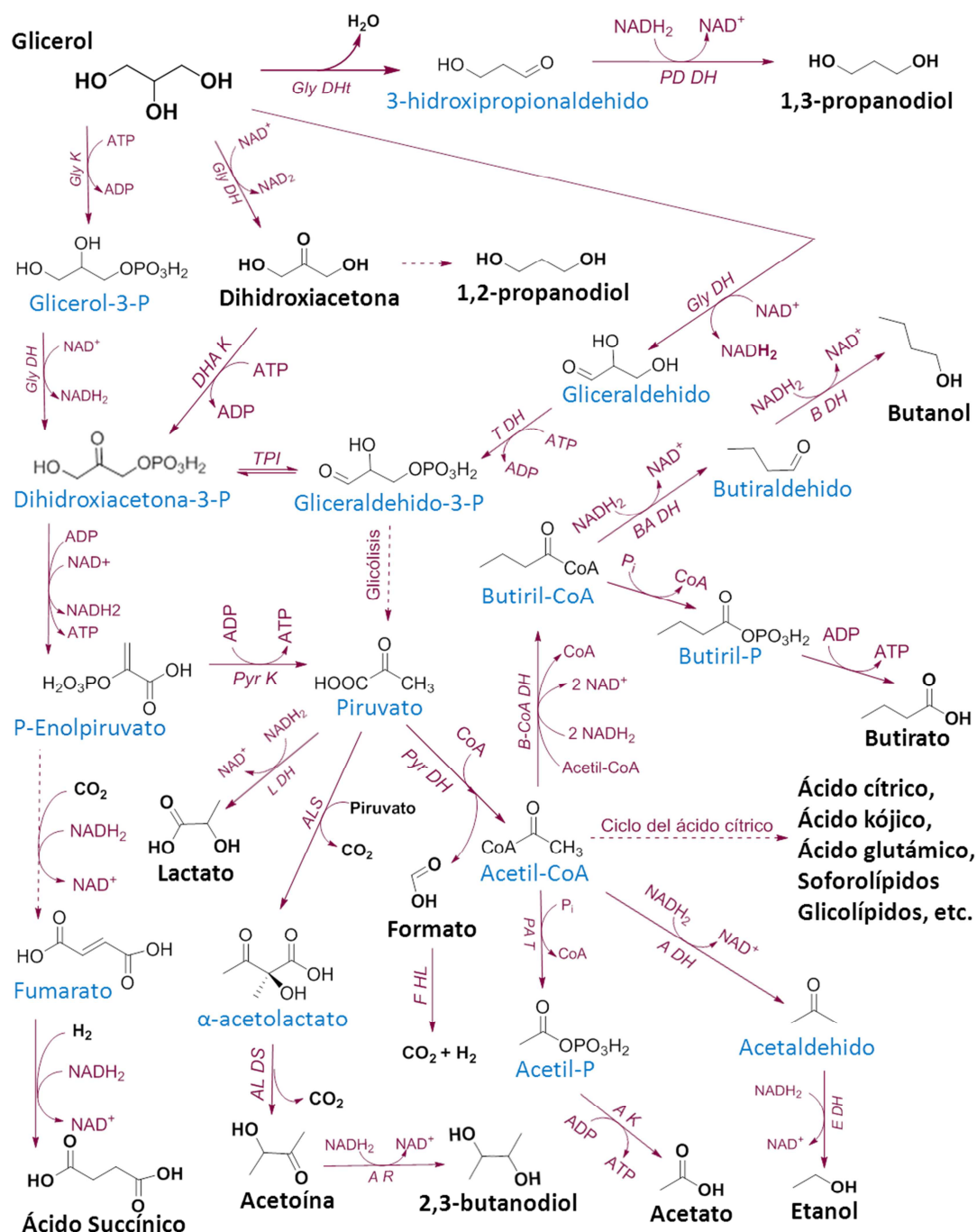


Figura 1.6 Principales rutas catabólicas del glicerol. Enzimas implicadas: glicerol quinasa (Gly K), glicerol deshidrogenasa (Gly DH), glicerol deshidratasa (GlyDHt), propanodioloxidoreductasa (PD OR), dihidroxiacetona quinasa (DHA K), triosa fosfato isomerasa (TPI), piruvato quinasa (Pyr K), lactato deshidrogenasa (L DH), piruvato deshidrogenasa (Pyr DH), acetaldehído deshidrogenasa (A DH), etanol deshidrogenasa (E DH), α-acetolactatosintetasa (ALS), acetolactatodescarboxilasa (AL DS), acetoina reductasa (A R), formato hidrógeno liasa (F HL), fosfato acetil transferasa (PAT), acetato quinasa (A K), butiraldehído deshidrogenasa (BA DH), butanol deshidrogenasa (B DH). Elaborado a partir de Hongwen y col., 2005; Johnson y Taconi, 2007; Murarka y col., 2008; Posada y Cardona, 2010; Clomburg y Gonzalez, 2011; Mattam y col., 2013.

Los productos finales obtenidos dependen del microorganismo empleado como biocatalizador así como de las condiciones de operación. Si bien la revalorización biotecnológica del glicerol da lugar a una amplia gama de compuestos, la variedad está limitada a los metabolitos involucrados en las rutas metabólicas. De manera ilustrativa, se va a realizar una descripción de dos procesos de revalorización biotecnológica del glicerol, a través de una revisión bibliográfica de los trabajos más relevantes publicados en los últimos años para cada producto. Por tratarse del objeto de estudio de la presente Tesis, la producción de 2,3-butanodiol (2,3-BD) va a recibir un estudio más detallado del Estado del Arte, que ha sido recogido en el Apartado siguiente.

DIHIDROXIACETONA

La dihidroxiacetona (DHA) es un producto de química fina, con diversas aplicaciones en la industria farmacéutica. Actualmente es el aditivo autobronceador más eficaz e inocuo conocido. Otros usos asociados a esta molécula son su empleo como edulcorante, como suplemento nutricional para el incremento de la masa muscular (Ivy, 1998; Stanko y col., 1999), como tratamiento del vitíligo recalcitrante (Fesq y col., 2001; Rajatanavin y col., 2008) y antídoto en las intoxicaciones de cianuro (Niknahad y O'Brien, 1996; Niknahad y Ghelichkhani, 2002). En la industria química es un reactivo versátil para la síntesis de distintos compuestos químicos, como el 1,2-propilenglicerol y el ácido láctico (Bicker y col., 2005).

Las bacterias del ácido acético del género *Gluconobacter* son empleadas en diferentes procesos biotecnológicos por su capacidad de oxidar sustratos regio- y estereoselectivamente, incluyendo la oxidación selectiva del alcohol secundario de la molécula de glicerol a DHA (Deppenmeier y col., 2002; Liebminger y col., 2014). Esta reacción es catalizada a través de dos tipos diferentes de enzimas glicerol deshidrogenasas. La primera de ellas se localiza en la cara externa de la membrana celular y es una enzima FAD- y PQQ-dependiente que permite la oxidación parcial de glicerol a DHA, producto que es acumulado en el medio extracelular. En el citoplasma se localiza la segunda enzima glicerol deshidrogenasa, NAD(P) y NAD-dependiente. La formación de DHA en el citoplasma comienza con la fosforilación del glicerol y su posterior oxidación a DHA-3-P, metabolito implicado en la ruta de las pentosas fosfato para el crecimiento celular (Khanna y col., 2012).

La cepas nativas productoras de DHA más estudiadas son *Gluconobacter oxydans* y *Gluconobacter frateurii*. El crecimiento de ambas especies experimenta inhibición por sustrato cuando se emplean elevada concentración inicial de glicerol. Por ello, diversos autores han

llevado a cabo el desarrollo del proceso empleando células en estado de *resting cells* o bien operando en *fed-batch*. Asimismo, han sido publicados numerosos trabajos sobre la construcción de cepas mejoradas genéticamente, mediante la sobreexpresión del gen que codifica la síntesis de la enzima glicerol deshidrogenasa localizada en la membrana así como la supresión de otras enzimas que puedan competir con el sustrato o transformar el producto de interés en otro metabolito (Habe y col. 2010; Li y col., 2010a; Lu y col., 2012; Lidia y Stanislaw, 2012). En la Tabla 1.3 se han recogido los mejores resultados encontrados en bibliografía, expresados en términos de concentración de DHA alcanzada, rendimiento respecto a la concentración inicial de glicerina (Y) y productividad (P).

Tabla 1.3 Resumen de los mejores resultados encontrados en bibliografía de producción de DHA a partir de glicerol.

Cepa	Estado del Catalizador	Forma de operación	C _{DHA} (g/L)	Y (g/g)	P [g/(L·h)]	Referencia
<i>G. oxydans</i> wild type	<i>Resting cells</i>	<i>Fed-batch</i>	156,3	0,898	2,17	Hu y col., 2011
<i>G. oxydans</i> mutante	Crecimiento	<i>Batch</i>	125,0	0,568	1,74	Habe y col., 2010
	<i>Resting cells</i>	<i>Batch</i>	139,7	0,607	1,94	
<i>G. oxydans</i> mutante	<i>Resting cells</i>	<i>Fed-Batch</i>	385,0	0,963	11,32	Li y col., 2010a
<i>G. frateurii</i> wild type	Crecimiento	<i>Fed-Batch</i>	125,8	0,905	2,60	Liu y col., 2013
<i>G. frateurii</i> wild type	Crecimiento	<i>Fed-Batch</i>	175,4	0,890	7,96	Zheng y col., 2016

Cabe destacar que en los últimos años la comunidad científica está profundizando sobre la posibilidad de llevar a cabo la producción de DHA a partir de glicerol por vía enzimática empleando la enzima glicerol deshidrogenasa como biocatalizador. Sin embargo, las investigaciones aún se encuentran en las etapas preliminares de obtención de un biocatalizador estable con el tiempo y resistente a la desactivación e inhibición por producto (Zheng y col., 2011; Rocha-Martin y col., 2014; Kumar y col., 2015).

1,3-PROPANODIOL

El 1,3-propanodiol (1,3-PD) es considerado un compuesto químico base o *platform chemical* debido al elevado número de aplicaciones que presenta en diversas industrias, como la de polímeros, cosméticos, cuidado personal y limpieza. El 1,3-PD es empleado principalmente como monómero para la producción del polímero tereftalato de politrimetileno (PTT),

sintetizado por policondensación de ácido tereftálico (Rodríguez y col., 2015). El PTT es un polímero termoplástico que presenta ventajas respecto al nylon, como su mayor suavidad que proporciona gran confort y comodidad, su capacidad para repeler sustancias y no mancharse y una extraordinaria recuperación después de someterlo a fuerzas de estiramiento. Por ello, las aplicaciones de este material se enmarcan en la industria textil, para la fabricación de lencería, trajes de baño, ropa deportiva, abrigos y alfombras. Actualmente, el PTT es comercializado mayoritariamente por la empresa Shell bajo el nombre de Corterra®, a través de una síntesis química, y por la empresa DuPont bajo el nombre de Sorona®, a través de una ruta bioquímica. Al margen de estas empresas que poseen las patentes correspondientes de dichos procesos, se han publicado en los últimos años cientos de patentes para proteger la producción de PTT, siendo el mayor foco de producción de éstas los países asiáticos.

La creciente demanda de 1,3-PD deja patente la necesidad de encontrar nuevas vías de producción que sustituyan a la síntesis química tradicional, caracterizada por las severas condiciones de presión y temperatura requeridas y el uso de catalizadores que encarecen el proceso así como la formación de compuestos intermedios tóxicos. Desde hace dos décadas, la producción por vía biotecnológica de 1,3-propanodiol a partir de sustratos renovables económicos ha recibido gran atención por la comunidad científica, destacando especialmente la síntesis a partir de glicerol (Kaur y col., 2012).

Respecto a los microorganismos productores de 1,3-PD cabe destacar que únicamente se ha detectado esta capacidad en especies bacterianas anaerobias facultativas. Las principales especies descritas hasta ahora son las siguientes:

- *Klebsiella pneumoniae* (Menzel y col., 1997; Liu y col., 2007; Misturini y col., 2013; Durgapal y col., 2014; da Silva y col., 2015),
- *Clostridium butyricum* (Gunzel y col., 1991; Zeng, 1996; Himmi y col., 1999; Chatzifragkou y col., 2011; Wilkens y col., 2012; Szymanowska-Powalowska, 2014; Szymanowska-Powalowska y Bialas, 2014),
- *Clostridium pasteurianum* (Moon y col., 2011; Johnson y Rehmann., 2016).
- *Citrobacter freundii* (Boenigk y col., 1993; Anand y Saxena, 2012; Metsoviti y col., 2013; Dozdzynska y col., 2014).
- *Lactobacillus reuteri* (Jolly y col., 2014; Vieira y col., 2015).

La biosíntesis de 1,3-PD está asociada al metabolismo anaerobio, dado que en condiciones aerobias los microorganismos derivan el metabolismo del glicerol hacia compuestos

de menor toxicidad para la célula. Sin embargo, la biosíntesis de 1,3-PD también puede tener lugar en condiciones de microaerobiosis (Saxena y col., 2009). El papel fisiológico de este diol dentro del metabolismo celular consiste en la regeneración del poder reductor NADH_2 requerido para la oxidación del glicerol a dihidroxiacetona. De esta forma, la ruta reductiva de producción de 1,3-PD está acoplada con la ruta oxidativa de fosforilación, tal y como se ha esquematizado en la Figura 1.7. La biotransformación del glicerol a 1,3-PD se realiza vía 3-hidroxi propionaldehído (3-HPA), reacción catalizada por la enzima glicerol deshidratasa que requiere como coenzima vitamina B12. Se sabe además que ésta es la etapa limitante del metabolismo (Kaur y col., 2012; Przystalowska y col., 2015).

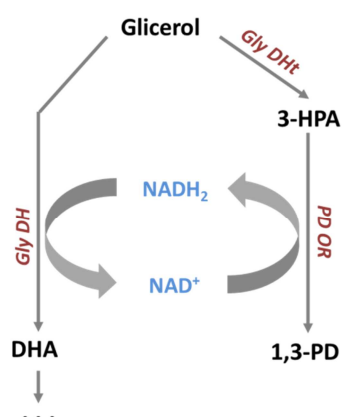


Figura 1.7 Ruta metabólica de conversión del glicerol a 1,3-propanodiol y dihidroxiacetona. Enzimas implicadas: glicerol deshidratasa (GlyDHT), propanodioloxidorreductasa (PD OR), glicerol deshidrogenasa (Gly DH).

Debido al acoplamiento de la ruta reductiva de biosíntesis del 1,3-PD con el resto del metabolismo oxidativo de la célula, la producción del diol lleva asociada la producción de otros metabolitos, principalmente los derivados del metabolismo fermentativo (etanol, ácido láctico, ácido acético, 2,3-butanodiol). Por ello, algunas líneas de investigación apuestan por la creación de microorganismo modificados genéticamente para minimizar la producción de subproductos. La estrategia más empleada es la delección del gen *ldha*, que codifica la síntesis de la enzima LDH, encargada de la transformación de piruvato a ácido láctico (Yang y col., 2007; Tang y col., 2009; Xu y col., 2009). Otros autores apuestan por la incorporación de los genes que codifican las enzimas implicadas en la ruta de síntesis del 1,3-PD (gen *dhaB* para la enzima glicerol deshidratasa; gen *dhaT* para la enzima propanodiol oxidorreductasa; gen *gdrAB* para el factor reactivante de la glicerol deshidratasa) en la bacteria *Escherichia coli*, ampliamente estudiada y de rápido crecimiento (Wang y col., 2007; Ma y col., 2009a; Tang y col., 2009).

En la Tabla 1.4 se han recogido los mejores resultados encontrados en bibliografía, expresados en términos de concentración de 1,3-PD alcanzada, rendimiento respecto a la concentración inicial de glicerina (Y) y productividad (P). Cabe destacar, que para este sistema también experimenta inhibición por sustrato, para concentraciones iniciales de glicerina elevadas, por lo que algunos autores han optado por el desarrollo del proceso en *fed-batch*.

Tabla 1.4 Resumen de los mejores resultados encontrados en bibliografía de producción de 1,3-PD a partir de glicerol.

Cepa	Tipo de glicerol	Forma de operación	C _{1,3-PD} (g/L)	Y (g/g)	P [g/(L·h)]	Referencia
<i>C. butyricum</i> wild-type	Puro	<i>Batch</i>	67,0	0,52	1,85	Himmi y col., 1999
	Crudo	<i>Batch</i>	65,4	0,54	1,67	
<i>C. butyricum</i> mutante	Puro	<i>Fed-Batch</i>	93,7	0,52	3,35	Wilkens y col., 2012
	Crudo	<i>Fed-Batch</i>	76,2	0,51	2,30	
<i>C. butyricum</i> wild-type	Crudo	<i>Fed-Batch</i>	67,9	0,55	0,78	Chatzifragkou y col.2011
<i>K. pneumoniae</i> wild-type	Puro	<i>Batch</i>	63,1	0,65	5,74	Zhao y col., 2006
<i>K. pneumoniae</i> wild-type	Puro	<i>Fed-Batch</i>	95,4	0,40	2,00	Xu y col., 2009
<i>K. pneumoniae</i> mutante	Puro	<i>Fed-Batch</i>	102,1	0,43	2,10	
<i>K. pneumoniae</i> mutante	Puro	<i>Batch</i>	102,7	0,41	1,47	Oh y col., 2012
<i>E. coli</i> mutante	Puro	<i>Fed-Batch</i>	104,4	0,90	2,61	Tang y col., 2009

1.4 PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE 2,3-BUTANODIOL

El interés por la producción biotecnológica del 2,3-BD se remonta a principios del s. XX (Harden y Walpole, 1906; Walpole, 1911; Fulmer, 1933). Debido a la delicada coyuntura mundial, algunas naciones optaron por el desarrollo la industria de los polímeros, más concretamente la de caucho sintético, para reducir así la dependencia con el Imperio Británico, que controlaba el comercio de caucho natural. Para su fabricación se emplea butadieno como monómero, que puede ser sintetizado a partir de 2,3-BD. A pesar de los buenos resultados logrados en escala piloto para producir 2,3-BD por vía fermentativa (Blackwood y col., 1949), el auge del petróleo permitió el desarrollo de nuevas rutas de síntesis química de 2,3-BD y butadieno de manera más económica (Vilet, 1981). Para la síntesis química del 2,3-BD se requiere 2,3-metil-oxaciclopropano, obtenido a través de la cloración y posterior ciclación de la

fracción de los hidrocarburos C₄, previa separación del butadieno y el isobuteno. En la Figura 1.8 se ha esquematizado la reacción de síntesis de 2,3-BD, que transcurre a través de hidrólisis ácida a elevada presión (50 bar) y temperatura (160 y 220 °C).

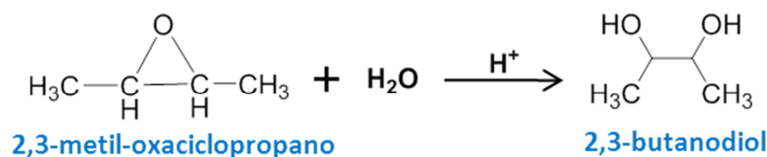


Figura 1.8 Reacción química de síntesis del 2,3-butanodiol.

No será hasta la década de los 80, cuando la crisis energética de las fuentes de energía fósiles haga retomar el interés por la producción biotecnológica del 2,3-BD. Comparado con la síntesis química, la ruta biotecnológica de producción de 2,3-BD es más económica. Debido a las ventajas medioambientales, especialmente cuando se emplea un sustrato renovable, la síntesis microbiana representa una ruta potencial para la comercialización de 2,3-BD (Zeng y Sabra, 2011). La Figura 1.9 muestra el mencionado auge de este producto mostrando la creciente evolución, especialmente importante en el último lustro, del número de publicaciones encontradas en la búsqueda “2,3-butanediol production” en *Web of Science*.

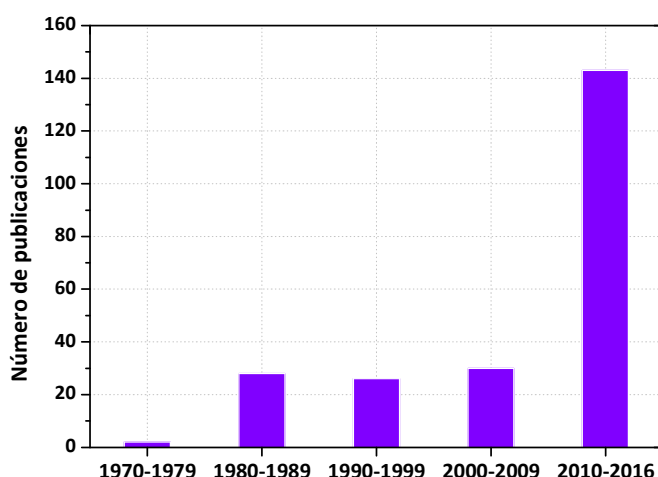


Figura 1.9 Evolución de las publicaciones relacionadas con la producción de 2,3-butanodiol.

1.4.1 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

El 2,3-BD, también denominado 2,3-butileno glicol y 2,3-dihidroxibutano, es una molécula que presenta dos grupos funcionales alcohol y dos centros quirales, localizados en los carbonos que soportan dichos grupos –OH. Esta estructura química particular le confiere tres

posibles configuraciones en el espacio, presentando de esta manera tres estereoisómeros, mostrados en la Figura 1.10: el isómero ópticamente inactivo (*R,S*)-2,3-BD, también conocido como *meso*-2,3-BD, el isómero levógiro (*2R,3R*)-(-)-2,3-BD y el isómero dextrógiro (*2S,3S*)-(+)-2,3-BD.

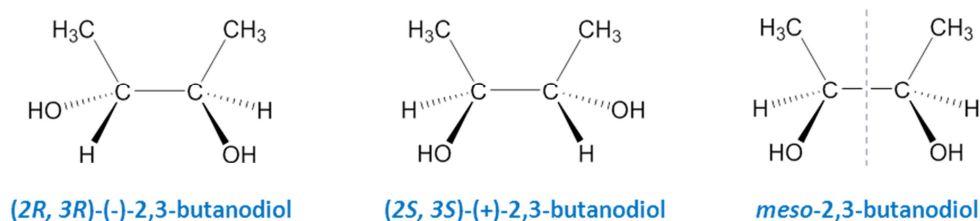


Figura 1.10 Estructura espacial de los estereoisómeros de la molécula de 2,3-butanodiol.

La fórmula molecular de este compuesto es $C_4H_{10}O_2$ y su peso molecular es 90,12 g/mol. Entre sus propiedades organolépticas destaca su suave sabor dulce. Es inodoro e incoloro. La presencia de los dos grupos alcohol le confiere una alta higroscopicidad y una elevada solubilidad en agua. El punto de ebullición depende del isómero, pero se encuentran en el intervalo 177 a 182 °C (Voloch y col., 1985).

1.4.2 APLICACIONES DEL 2,3-BUTANODIOL

El 2,3-BD se encuentra presente en multitud de procesos industriales: es empleado como portador de fármacos, en la formulación de perfumes, suavizantes, insecticidas y pesticidas, explosivos, plásticos y tintas. Entre sus aplicaciones directas destacan su poder como anticongelante, debido al bajo punto de congelación (-60 °C), y su empleo como aditivo en gasolinas, elevando el índice de octano del combustible (Ji y col., 2009).

El 2,3-BD es considerado como un compuesto químico de base o *bulk chemical*, a partir del cual es posible llevar a cabo la síntesis a productos de mayor valor añadido de diferente naturaleza. En la Figura 1.11 se han esquematizado las principales vías de conversión química del 2,3-BD, que responden a la reactividad química del diol.

La deshidratación del 2,3-BD conduce a la obtención de metiletilcetona (MEK). Esta reacción puede ser catalizada por catalizadores químicos como la alúmina o el ácido sulfúrico o bien de manera biológica empleando la enzima diol deshidratasa de la especie *Lactobacillus brevis* (Ji y col., 2009). El interés del MEK reside tanto en sus propiedades como disolvente de resinas y lacas, como por su aplicación como aditivo de combustibles fósiles (Villet, 1981). Una deshidratación más profunda de la molécula de 2,3-BD da lugar al butadieno, uno de los

compuestos químicos más importantes en la industria química por su papel en la síntesis de caucho sintético, como se comentó anteriormente.

La deshidrogenación de la molécula de 2,3-BD da lugar a acetoina, si la reacción únicamente transcurre en uno de los radicales $-OH$, o bien a diacetilo, si se oxidan los dos grupos funcionales. Ambas moléculas destacan sus propiedades organolépticas, empleándose en la industria alimentaria como aromatizantes, especialmente en los productos lácteos. Ambos compuestos pueden ser sintetizados de manera biológica, gracias a enzimas alcohol deshidrogenasa de la membrana citoplasmática y aldehído deshidrogenasa (Xiao y Xu, 2007; Ji y col., 2009).

La acetalización del 2,3-BD conduce a la formación del compuesto cetal 2,3-butanodiol de acetona, cuya estructura con cuatro radicales metilo le convierte en un potencial agente para la formulación de gasolinas, debido a la estructura química similar al ampliamente utilizado metil *tert*-butil éter. La esterificación del 2,3-BD conduce a la formación de precursores de distintos polímeros termoplásticos, como el nitrato celulosa, celulosa acetato butirato, polivinil cloruro, poliacrilatos y polimetilacrilatos (Voloch y col., 1985).

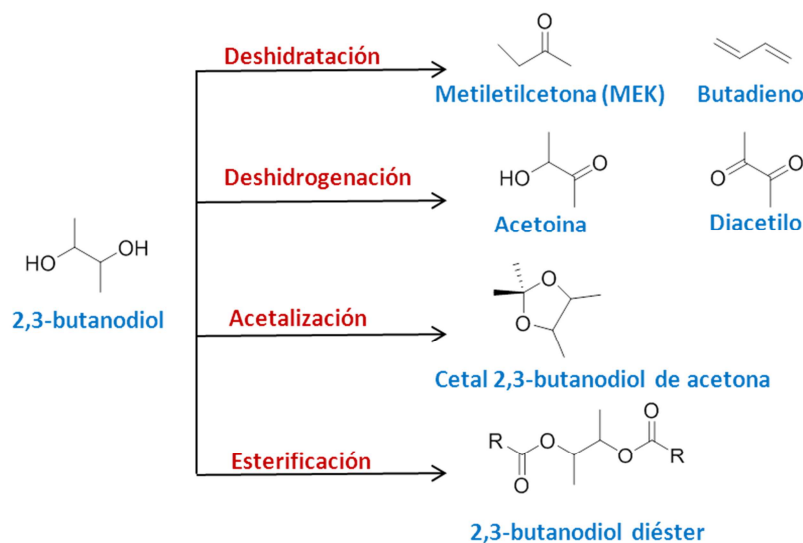


Figura 1.11 Principales vías de conversión del 2,3-butanodiol por vía química (Ji y col., 2011).

1.4.3 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE 2,3-BD

Son diversas las especies que presentan capacidad de sintetizar 2,3-BD. Sin embargo, sólo un número reducido de ellas son capaces de hacerlo en extensión significativa. Aunque se han publicado más de 200 artículos en torno a la producción biotecnológica de 2,3-BD, todos ellos se centran en el empleo de un grupo reducido de biocatalizadores: bacterias que

pertenecen a los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Bacillus*. Cabe destacar que todos los microorganismos descritos son anaerobios facultativos. A continuación se enumeran las principales especies productoras de 2,3-BD, junto con la información del volumen de artículos encontrados en bibliografía al respecto de cada uno de ellos.

- *Klebsiella pneumoniae* (anteriormente *Aerobacter aerogenes*). Se han publicado 71 trabajos desde 1946 (Adams y col., 1946; Huynh y col., 2015).
- *K. oxytoca*. Se han publicado 50 trabajos desde 1984 (Jansen y col., 1984; Kim y col., 2015).
- *Enterobacter aerogenes*. Se han publicado 12 trabajos desde 1980 (Chua y col., 1980; Choi y col., 2016).
- *Serratia marcescens*. Se han publicado 21 trabajos desde 1947 (Neish y col., 1947; Zhang y col., 2016).
- *Paenibacillus polymyxa* (anteriormente *Bacillus polymyxa*). Se han publicado 40 trabajos desde 1945 (Neish, 1945; Xie y col., 2015).
- *Bacillus subtilis*. Se han publicado 22 trabajos desde 1947 (Blackwood y col., 1947; Fu y col., 2016).
- *B. amyloliquefaciens*. Se han publicado 8 trabajos desde 1990 (Alam y col., 1990; Yang y col., 2015).

De las cepas anteriormente nombradas, los resultados más prometedores han sido obtenidos con bacterias pertenecientes al grupo de riesgo biológico 2, caracterizado por los riesgos que entrañan para el hombre en condiciones de inmunodeficiencia por parte de los microorganismos que lo forman. Por ello, uno de los grandes retos para la producción de 2,3-BD a escala industrial es la obtención de biocatalizadores seguros.

1.4.4 SUSTRATOS EMPLEADOS

Existe una amplia variedad de sustratos que pueden ser fermentados por distintos microorganismos para producir 2,3-BD, pudiéndose clasificar en azúcares puros, sustratos lignocelulósicos y sustratos no celulósicos (Ji y col., 2011). Desde el punto de vista económico y medioambiental, el empleo de residuos procedentes de otras industrias como materia prima para la fermentación es especialmente interesante, sobre todo si se tiene en cuenta que la mayor partida de costes en un bioproceso derivan del coste del sustrato (Wilke y Vorlop, 2004).

Respecto a los azúcares puros, hay una amplia gama de hexosas y pentosas que pueden ser fermentados por bacterias, entre las que destacan glucosa, manosa, galactosa, xilosa, arabinosa, celobiosa, lactosa y sacarosa.

Los sustratos lignocelulósicos hacen referencia a biomasa procedente de residuos vegetales y están constituidos por carbohidratos (celulosa, hemicelulosa) y polímeros aromáticos (lignina). Los azúcares constituyentes (hexosas y pentosas) pueden ser liberadas a través de hidrólisis y, de esta forma, pueden ser metabolizados por bacterias. Sin embargo, durante el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos también se liberan algunos compuestos citotóxicos que pueden inhibir el crecimiento microbiano, tales como furanos, compuestos fenólicos y ácidos orgánicos (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).

El gran interés por los sustratos lignocelulósicos deriva de su abundancia, disponibilidad y carácter renovable. Multitud de residuos agrícolas están siendo estudiados como potencial materia prima para el proceso de producción de 2,3-BD: hidrolizados de madera, de maíz y rastrojos de diferentes plantas.

Dentro de los sustratos no celulósicos se enmarcan residuos de la industria alimentaria, tales como melazas de maíz y remolacha, melazas de caña de azúcar, suero de la industria láctica, etc. (Ji y col., 2009). Dentro de esta categoría se sitúa también el glicerol, cuyas características y ventajas han sido descritas previamente a lo largo de este Capítulo.

1.4.5 INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN

El objeto del presente Apartado es la identificación de las variables de operación más influyentes en el proceso de producción de 2,3-BD por vía biotecnológica, con independencia del microorganismo y el sustrato carbonado empleados. Por tanto, se pretende es ilustrar cuáles son las principales variables que determinan la efectividad de la operación, sin profundizar en los valores óptimos en cada caso.

TEMPERATURA

En cualquier bioproceso, con independencia de si el biocatalizador empleado es un microorganismo completo o una enzima, la temperatura de operación es determinante para el éxito de la operación, puesto que de ella depende fuertemente la actividad de las enzimas implicadas y el mantenimiento e integridad celulares. Si bien la temperatura óptima de operación depende del microorganismo empleado, se puede generalizar diciendo que en cada caso va a estar próxima a la temperatura óptima de crecimiento de la especie bacteriana. Para la

mayoría de las especies productoras de 2,3-BD el intervalo de temperatura es 30-37 °C (Celinska y Grajek, 2009).

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

La formulación del medio de cultivo debe ser minuciosamente evaluada para cada especie, ya que debe proveer los nutrientes esenciales para el crecimiento bacteriano y su mantenimiento, así como aquellos factores que aseguren una síntesis eficiente de 2,3-BD, como vitaminas y elementos traza (Ji y col., 2011). Además del sustrato carbonado y la fuente de nitrógeno, diversos autores han estudiado la influencia del empleo de nutrientes complejos, como extracto de levadura y melazas, y de cationes metálicos, como cobalto, sodio, hierro y manganeso (Laube y col., 1984; Petrov y Petrova, 2009; Wang y col., 2016).

Asimismo destacan los estudios sobre la influencia del acetato como regulador de la ruta metabólica de síntesis del 2,3-BD, actuando no sólo como inductor de la producción del 2,3-BD sino también como inhibidor de la oxidación del diol a acetoina (Larsen y Stormer, 1973; Yu y Sadler, 1982; Wang y col., 2016).

DISPONIBILIDAD DE OXÍGENO

Los microorganismos productores de 2,3-BD son bacterias anaerobias facultativas, caracterizadas por la obtención de energía a partir del metabolismo de un sustrato carbonado vía respiración, en presencia de oxígeno, y vía fermentativa, en ausencia de éste, tal y como se ha esquematizado en la Figura 1.13.

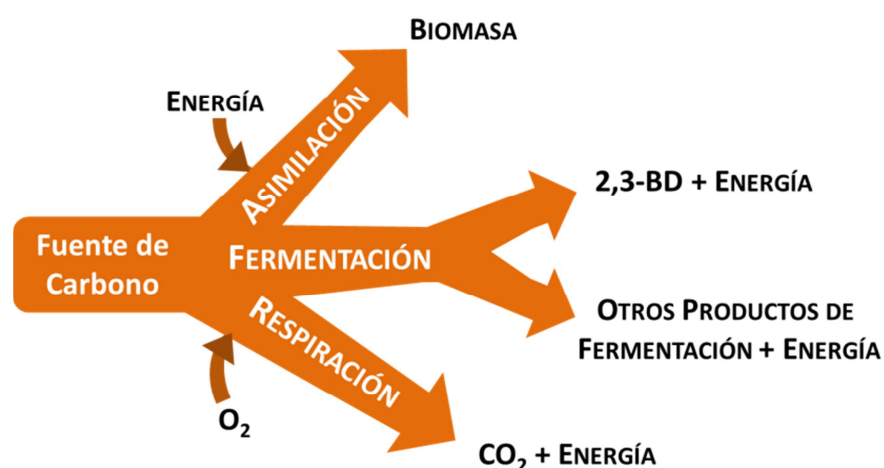


Figura 1.13 Esquema del metabolismo del sustrato carbonado en microorganismos anaerobios facultativos (Elaborado a partir de Voloch y col., 1985).

El 2,3-BD es un producto del metabolismo fermentativo anaerobio en términos de regeneración de la coenzima NAD^+ a partir de su forma reducida (NADH) para asegurar que la glicólisis pueda seguir teniendo lugar, dado que es la fuente de ATP en condiciones anaerobias. En condiciones aerobias, se produce la oxidación completa del sustrato carbonado a través de la respiración, para obtener dióxido de carbono y energía como productos finales (Celinska y Grajek, 2009).

A pesar de que el 2,3-BD es un producto de la ruta metabólica fermentativa, se sabe que la disponibilidad de oxígeno es la variable de operación más influyente en su producción. Por un lado, si la disponibilidad de oxígeno es demasiado limitada, la menor concentración de biomasa determina que la producción de 2,3-BD no sea significativa. Por otro lado, un exceso de oxígeno produce la desactivación de la enzima α -acetolactatosintetasa, enzima involucrada en la síntesis de 2,3-BD a partir de piruvato, y la desviación del metabolismo hacia la producción de dióxido de carbono vía respiración. Estos efectos contrapuestos hacen que la producción de 2,3-BD presente un máximo para unas determinadas condiciones de disponibilidad de oxígeno, como puede observarse en la Figura 1.14. Esta Figura deja además de manifiesto que no sólo la producción de 2,3-BD sino también la distribución del resto de productos de la ruta fermentativa depende directamente de la disponibilidad de oxígeno (Voloch y col., 1985; Blomqvist y col., 1993).

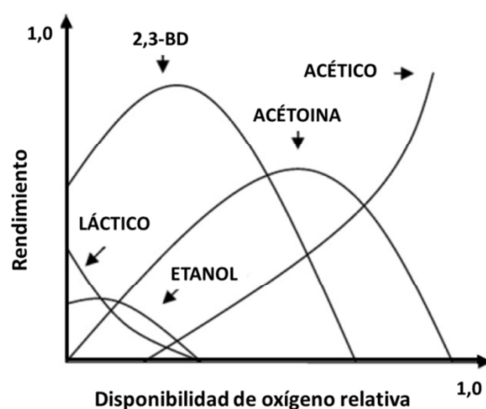


Figura 1.14 Efecto de la disponibilidad de oxígeno en la distribución de productos de la ruta metabólica en *P. polymyxa* (Elaborado a partir de Maddox, 1996).

Por tanto, se requieren condiciones de microaerobiosis para maximizar la producción de 2,3-BD, entendiendo por condiciones microaerobias aquellas en las que la cantidad de oxígeno transferido al caldo de cultivo es consumida totalmente por las células, de manera que el oxígeno disuelto en el caldo permanece en cero. Diversos autores han querido determinar las

condiciones de disponibilidad de oxígeno óptimas para la producción de 2,3-BD, en términos de velocidad de transferencia de oxígeno (*OTR*), velocidad de consumo de oxígeno (*OUR*) y coeficiente respiratorio (*RQ*) (Beronio y Tsao, 1993; Zeng y col., 1990 y 1994; Nakashimada y col., 1998). Sin embargo, estas variables no son fáciles de controlar, por lo que la mayoría de las investigaciones se han centrado en el estudio de la influencia de la velocidad de agitación y caudal de aireación, variables que determinan la disponibilidad de oxígeno en el biorreactor (Ji y col., 2009; Petrov y Petrova, 2010; Yeng y col., 2014).

pH

El pH es la variable de operación de mayor influencia en la producción de 2,3-BD, después de la disponibilidad de oxígeno. Esta dependencia está íntimamente ligada con la función fisiológica asociada a la biosíntesis de 2,3-BD. El papel del diol está relacionado con una estrategia homeostática celular de prevención de la acidificación intracelular. La producción y acumulación de otros productos del metabolismo fermentativo de carácter ácido, como ácido succínico, fórmico, láctico y acético, provocan la caída drástica del pH. Esta acidificación del medio induce la desviación de la ruta metabólica hacia compuestos neutros, como el 2,3-BD, evitando así la acumulación de compuestos más tóxicos (Maddox, 1996).

El pH del medio de cultivo influye no sólo en el metabolismo celular y la distribución de productos sino también en el crecimiento celular. Por ello, diversos autores han llevado a cabo distintos estudios y estrategias de pH con diversos objetivos:

- Realizar el proceso bajo dos etapas de control de pH: en primer lugar se imponen aquellas condiciones que favorezcan el crecimiento del microorganismo y, posteriormente, aquellas que favorezcan la producción de 2,3-BD (Priya y col., 2016).
- Saltos de pH periódicos que maximizan la concentración de biomasa y de 2,3-BD (Petrov y Petrova, 2010).
- Determinar el pH también que maximiza la relación entre el 2,3-BD y el metabolito precursor de la ruta metabólica, la acetoína (Zhang y col., 2014).

Aunque se puede generalizar que las condiciones ácidas favorecen la producción de 2,3-BD, el valor óptimo de estas variables depende fuertemente del microorganismo y el sustrato empleado (Celinska y Grajek, 2009).

CONCENTRACIÓN INICIAL DE SUSTRATO

La concentración inicial de sustrato es uno de los parámetros que habitualmente debe ser optimizado en cualquier fermentación, debido a su relación con los posibles fenómenos de inhibición, principalmente del crecimiento microbiano. Cuando se emplean azúcares puros como sustrato, el rango de concentraciones iniciales más frecuente está entre 5-10% (p/p) (Garg y Jain, 1995). Diversos autores han demostrado que el empleo de elevadas concentraciones de sustrato provoca inhibición en el crecimiento celular y en la producción de 2,3-BD. A modo ilustrativo, en la Figura 1.12 se encuentra representada la influencia de la concentración inicial de glucosa en la concentración final de 2,3-BD alcanzada, cuando se emplea *Bacillus licheniformis* como biocatalizador, correspondiente al estudio publicado por Jurchesco en 2013 (Juschesco y col., 2013). Como puede observarse en la citada Figura, las concentraciones de glucosa superiores a 180 g/L repercuten directamente en la concentración final de producto, desprendiéndose de los resultados de éste y otros artículos la posibilidad de desarrollar la operación en *fed-batch*, para evitar los fenómenos de inhibición por sustrato y mejorar la producción de 2,3-BD.

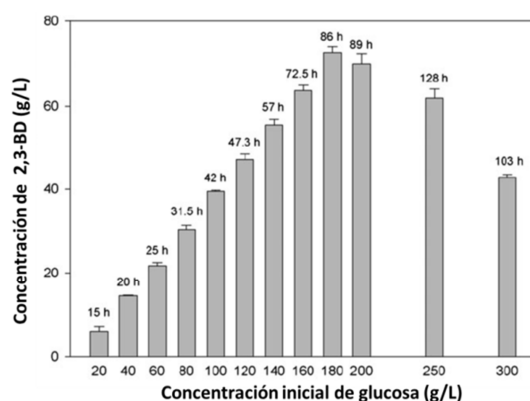


Figura 1.12 Efecto de la concentración inicial de glucosa en la producción de 2,3-butanodiol empleando *Bacillus licheniformis* (Jurchescu y col., 2013).

En la Tabla 1.5 se han recogido los resultados publicados en los últimos años para la producción de 2,3-BD a partir de diversos sustratos carbonados, en términos de concentración alcanzada, rendimiento (Y) y productividad (P), cuando la operación se lleva a cabo en *fed-batch*. Cabe destacar, que el sustrato carbonado más estudiado es la glucosa, a partir del cual se obtienen las más altas concentraciones y productividades [150 g/L y 3,95 g/(L·h)]. Sin embargo, de mayor interés por sus ventajas medioambientales son aquellos trabajos que emplean residuos vegetales como sustrato (melazas de caña y maíz y distintos hidrolizados de productos vegetales). Por último, cabe destacar que los estudios publicados sobre la producción de 2,3-BD

a partir de glicerol son escasos y las concentraciones alcanzadas más reducidas, a excepción de los resultados publicados por Cho en 2015 (Cho y col., 2015).

Tabla 1.5 Resumen de los mejores resultados encontrados en bibliografía de producción de 2,3-BD por vía biotecnológica cuando la operación se lleva a cabo en fed-batch.

Sustrato	Cepa	C _{2,3-BD} (g/L)	Y (g/g)	P (g/(L·h))	Referencia
Glucosa	<i>K. pneumoniae</i> wild type	92,4	0,43	2,10	Qin y col., 2006
		150,0	0,40	3,95	Ma y col., 2009b
	<i>K. pneumoniae</i> mutante	91,0	0,45	1,62	Rathnasingh y col., 2016
	<i>B. amyloliquefaciens</i> wild type	92,3	-	0,96	Yang y col., 2011
	<i>K. oxytoca</i> mutante	115,0	0,41	2,27	Kim y col., 2013
	<i>B. licheniformis</i> wild type	144,7	-	1,14	Jurchescu y col., 2013
	<i>E. coli</i> mutante	82,0	0,64	2,73	Kay y Jewett, 2015
	<i>B. subtilis</i> mutante	103,7	0,49	0,46	Fu y col., 2016
Sacarosa	<i>S. marcescens</i> wild type	139,9	0,95	3,49	Zhang y col., 2010
	<i>Klebsiella</i> sp. Wild type	119,4	0,40	2,18	Xin y col., 2016
Melazas de caña	<i>E. aerogenes</i> mutante	98,7	-	2,74	Jung y col., 2013
	<i>K. pneumoniae</i> mutante	76,2	-	2,31	Lee y col., 2014
Melazas de maíz	<i>K. pneumoniae</i> wild type	78,9	0,47	1,30	Wang y col, 2010
Hidrolizados de aguaturma	<i>K. pneumoniae</i> wild type	84,0	0,29	2,29	Sun y col., 2009
		80,5	0,23	1,18	Li y col., 2010b
Hidrolizado de maíz	<i>B. licheniformis</i> wild type	74,0	0,95	2,10	Li y col., 2014
Hidrolizado de piel de manzana	<i>B. licheniformis</i> wild type	113,0	-	0,69	Biakowska y col., 2015
Glicerol	<i>K. pneumoniae</i> wild type	49,2	0,36	0,18	Petrov y Petrova, 2009
		70,0	0,38	0,45	Petrov y Petrova, 2010
	<i>B. amyloliquefaciens</i> wild type	43,1	0,38	0,45	Yang y col., 2013
	<i>K. oxytoca</i> mutante	131,5	0,38	0,84	Cho y col., 2015
Glicerol + Melazas	<i>B. amyloliquefaciens</i> mutante	102,3	0,44	1,16	Yang y col., 2015

1.5 OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO

La presente Tesis Doctoral se enmarca dentro de la investigación desarrollada para la ERA-Net europea sobre biotecnología industrial (ERA-IB) titulado “*Production and Upgrading of 2,3-Butanediol from Biomass*” (PUBB). El objeto de la misma es el desarrollo del proceso de producción de 2,3-BD a partir de glicerol por vía biotecnológica, empleando como biocatalizador microorganismos no patógenos (encuadrados en el grupo de riesgo 1). Para abordar este objetivo global se empleará, como punto de partida, la metodología para el desarrollo de bioprocesos del Grupo de Investigación *Fisicoquímica de Procesos Industriales y Medioambientales* (FQPIMA-910134), del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid, en el que se realiza la presente Tesis Doctoral.

Para abordar ese gran objetivo, se hace necesario el desarrollo, puesta a punto y calibración de métodos de análisis para realizar el seguimiento de forma cuantitativa de todos los componentes del proceso de interés. Asimismo, se requiere acoplar la metodología experimental general desarrollada en el grupo de investigación a las características particulares del proceso productivo de 2,3-BD. Por ello, a lo largo de trabajo requerido para el desarrollo del proceso estudiado, se pondrán a punto procedimientos experimentales para las diversas etapas que sea necesario abordar.

Una vez establecidos procedimientos de análisis en primer lugar se debe realizar la selección del biocatalizador que se vaya a emplear en el proceso. Debido a la necesidad de identificar nuevas especies productoras de 2,3-BD no patógenas, el punto de partida de la investigación serán los resultados obtenidos en un amplio *screening* de microorganismos realizado por Biopolis, S.L., miembro colaborador del citado proyecto. Por lo tanto, el objetivo del primer capítulo de resultados de la presente Tesis Doctoral será la evaluación de la capacidad productora de los microorganismos resultantes del estudio realizado por Biopolis S.L. Para ello, será necesario desarrollar procedimientos experimentales estandarizados para la conservación y el crecimiento celular de las diferentes cepas recibidas, que aseguren la obtención de resultados reproducibles y repetitivos.

Debido a que se busca la elección de una única cepa, se realizarán estudios preliminares (empleando los diferentes microorganismos seleccionados entre los recibidos de Biopolis) para decidir cuál es la cepa con la que se continuará el trabajo de desarrollo del proceso. Para ello se estudiará la influencia en el rendimiento y productividad a 2,3-BD de variables como la temperatura de operación, la presencia en el medio de cultivo de ácidos orgánicos que puedan

activar la ruta metabólica de 2,3-BD (ácido acético y ácido cítrico, según se observa en literatura) y la concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo, mediante un diseño de experimentos siguiendo la metodología propuesta por Genichi Taguchi (Taguchi, 1978). De la comparación del comportamiento de los diferentes microorganismos probados empleando glicerina pura y glicerol crudo, se seleccionará la especie más eficiente para el proceso, que será la empleada en los estudios ulteriores de la presente Tesis Doctoral.

Una vez determinada la cepa microbiana para llevar a cabo el desarrollo del proceso de la biotransformación de glicerina en 2,3-BD, se considerarán dos posibilidades respecto al estado metabólico celular con la finalidad de determinar cuál de los estados del biocatalizador es el más adecuado para el desarrollo del proceso a nivel industrial, por la efectividad de la transformación así como por las limitaciones técnicas que pudieran implicar cada uno de ellos (células en estado de crecimiento y células en estado de reposo o *resting cells*).

Los estudios experimentales, con el biocatalizador en ambos estados celulares, se van a llevar a cabo en un biorreactor tipo tanque agitado. Para el desarrollo del proceso, se va a estudiar la influencia de las variables de operación identificadas como clave en la revisión bibliográfica realizada a tal efecto, a saber: influencia del pH, influencia de las condiciones hidrodinámicas (para determinar la influencia del oxígeno disuelto en el proceso). Asimismo, se estudiará la influencia de la forma de operación (*batch* o *fed-batch*).

En el caso de la operación catalizada por células en estado de *resting cells* será necesario además realizar previamente la optimización de las condiciones de obtención del biocatalizador.

Asimismo, se realizará una comparación entre los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral con los resultados publicados previamente por otros autores en este campo, como una primera aproximación para la implementación de este proceso a escala industrial con la cepa estudiada frente a las utilizadas por otros autores.

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la producción de 2,3-BD se abordará el desarrollo de un modelo cinético sencillo (no estructurado-no segregado) que describa la evolución de los compuestos implicados en la ruta metabólica en cada uno de los casos (crecimiento y *resting cells*). Toda la información obtenida podrá ser un punto de partida sólido para el cambio de escala del proceso industrial de producción de 2,3-BD a partir de glicerol crudo proveniente de la producción de biodiésel.

1.6 BIBLIOGRAFÍA

Abbaszaadeh, A.; Ghobadian, B.; Omidkhah, M. R. y Najafi, G. (2012). Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Conversion and Management*, 63: 138-148.

Adams, G.A. y **Leslie**, J. D. (1946). Production and properties of 2,3-butanediol. The effects of surface-volume ratio and reduced pressure on the fermentation of carbohydrates by *Aerobacillus polymyxa* and *Aerobacter aerogenes*. *Canadian Journal of Research*, 24(F): 107-116.

Alam, S.; Capit, F.; Weigand, W. y Hong, J. (1990). Kinetics of 2,3-butanediol fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*: Effect of initial substrate concentration and aeration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 47(1): 71-84.

Almeida, J. R. M.; Favaro, L. C. L. y Quirino, B. F. (2012). Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for Biofuels*, 5: 48-64.

Anand, P. y **Saxena**, R. K. (2012). A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*, 29(2): 199-205.

Ardi, M. S.; Aroua, M. K. y Hashim, N. A. (2015). Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: A review. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 42: 1164-1173.

Atadashi, I. M.; Aroua, M. K.; Aziz, A. R. A. y Sulaiman, N. M. N. (2013). The effects of catalysts in biodiesel production: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19(1): 14-26.

Ayoub, M. y **Abdullah**, A. Z. (2012). Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5): 2671-2686.

Bagheri, S.; Julkapli, N. M. y Yehye, W. A. (2015). Catalytic conversion of biodiesel derived raw glycerol to value added products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41: 113-127.

Behr, A. y **Gomes**, J. P. (2010). The refinement of renewable resources: New important derivatives of fatty acids and glycerol. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112: 31-50.

Beronio, P. B. y **Tsao**, G. T. (1993). Optimization of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* through oxygen transfer rate control. *Biotechnology and Bioengineering*, 42: 1263-1269.

Bialkowska, A. M.; Gromek, E.; Krysiak, J.; Sikora, B.; Kalinowska, H.; Jedrzejczak-Krzepkowska, M.; Kubik, C.; Lang, S.; Schutt, F.; Turkiewicz, M. (2015). Application of enzymatic apple pomade hydrolysate to production of 2,3-butanediol by alkaliphilic *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 42(12): 1609-1621.

Bicker, M.; Endres, S.; Ott, L. y Vogel, H. (2005). Catalytical conversion of carbohydrates in subcritical water: A new chemical process for lactic acid production. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 239: 151-157.

Blackwood, A.C.; Neish, A. C.; Brown, W. E. y Ledingham, G. A.(1947).Production and properties of 2,3-butanediol. XVII. Fermentation of glucose by strains of *Bacillus Subtilis*. *Canadian Journal of Research*,25(1): 56-64.

Blackwood, A.C.; Wheat, J.A.; Leslie, J.D.; Ledingham, G.A. y Simpson, F.T. (1949).Production and properties of 2,3-butanediol. XXXI. Pilot plant studies on the fermentation of wheat by *Aerobacillus polymyxa*. *Canadian Journal of Research*,27(F):199–210.

Blomqvist, K.; Nikkola, M.; Lehtovaara, P.; Suihko, M. L.; Airaksinen, U.; Straby, K. B.; Knowles, J. K. y Penttila, M. E. (1993). Characterization of the genes of 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology* 175(5): 1392-1404.

Boenigk, R.; Bowien, S. y Gottschalk, G. (1993). Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(4): 453-457.

Boury-Jamot, M.; Sougrat, R.; Tailhardat, M.; Le Varlet, B.; Bonté, F.; Dumas, M. y Verbavatz, J. M. (2006). Expression and function of aquaporins in human skin: Is aquaporin-3 just a glycerol transporter? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758: 1034-1042.

Celinska, E. y Grajek, W. (2009). Biotechnological production of 2,3-butanediol – Current state and prospects. *Biotechnology Advances*, 27: 715-725.

Chan-Thaw, C. E.; Campisi, S.; Wang, D.; Prati, L. y Villa, A. (2015). Selective oxidation of raw glycerol using supported AuPd nanoparticles. *Catalysts*, 5: 131-144.

Chatzifragkou, A.; Papanikolaou, S.; Dietz, D.; Doulgeraki, A.I.; Nychas, G. J. E.; Zeng, A.P. (2011) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91:101–112.

Cho., S.; Kim, T.; Woo, H. M.; Kim, Y.; Lee, J. y Um, Y. (2015). High production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1. *Biotechnology for biofuels* 8: 146-158.

Choi, M. H.; Kim, S. J.; Kim, J. W.; Park, Y. C. y Seo, J. H. (2016). Molecular cloning and expression of *Enterobacter aerogenes* alpha-acetolactate decarboxylase in pyruvate decarboxylase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* for efficient 2,3-butanediol production. *Process Biochemistry*, 51(2): 170-176.

Chua, J. W.; Erarslan, A.; Kinoshita, S. y Taguchi, H. (1980). 2,3-butanediol production by immobilized *Enterobacter aerogenes* IAM1133 with kappa-carrageenan. *Journal of Fermentation Technology*, 58(2): 123-127.

Clomburg, J. M. y Gonzalez, R. (2011). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1,2-propanediol from glycerol. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4): 867-879.

Clomburg, J. M. y Gonzalez, R. (2013). Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends in Biotechnology*, 31(1): 20-28.

Da Silva, G. P.; Mack, M. y Contiero, J. (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27: 30-39.

Da Silva, G. P.; de Lima, C. J. B. y Contiero, J. (2015). Production and productivity of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. *Catalysis Today*, 257: 259-266.

Demirbas, A. (2006). Biodiesel: a realistic fuel alternative for diesel engines. *Springer*.

Deppenmeier, U.; Hoffmeister, M. y Prust, C. (2002). Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 233-242.

Dozdzyńska, A.; Pawlicka, J., Kubiak, P.; Kosmider, A.; Pranke, D.; Olejnik-Schmidt, A. y Czaczyk, K. (2014). Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei* – Newly isolated strains from the Enterobacteriaceae. *New Biotechnology*, 31(5): 402-410.

Durgapal, M.; Kumar, V.; Yang, T. H.; Lee, H. J.; Seung, D. y Park, S. (2014). Production of 1,3-propanediol from glycerol using the newly isolated *Klebsiella pneumoniae* J2B. *Biochemical Engineering Journal*, 64: 106-118.

Estevez, R.; Lopez-Pedrajas, S.; Blanco-Bonilla, F.; Luna, D. y Bautista, F. M. (2015). Production of acrolein from glycerol in liquid phase on heterogeneous catalysts. *Chemical Engineering Journal*, 282: 179-186.

Esteban, J.; Ladero, M.; Molinero, L. y Garcia-Ochoa, F. (2014). Liquid-liquid equilibrium for the ternary systems DMC-methanol-glycerol, DMC-glycerol carbonate-glycerol and the quaternary system DMD-methanol-glycerol carbonate-glycerol at catalytic reacting temperatures. *Chemical Engineering Research and Design*, 92: 1797-1805.

Fakas, S.; Makri, A.; Bellos, S. y Aggelis, G. (2009). Pathways to aerobic glycerol catabolism and their regulation. *Microbial conversion of raw glycerol*: 9-18. Nova Science Publishers, New York, USA.

Fesq, H.; Brockow, K.; Strom, K. Mempel, M.; Ring, J. y Abeck, D. (2001). Dihydroxyacetone in a new formulation – A powerful therapeutic option in vitiligo. *Dermatology*, 203(3): 241-243.

Fu, J.; Huo, G.; Feng, L. L.; Mao, Y. F.; Wang, Z. W.; Ma, H. W.; Chen, T. y Zhao, X. M. (2016). Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for chiral pure meso-2,3-butanediol production. *Biotechnology for Biofuels*, 9: 90-104.

Fulmer, E. I.; Christensen, L. M. y Kendall, A. R. (1933). Production of 2,3-butylene glycol by fermentation. *Industrial Chemical Engineering*, 25: 798-800.

Garg, S. K. y Jain, A. (1995). Fermentative production of 2,3-butanediol: A review. *Bioresource Technology*, 51: 103-109.

Gunzel, B.; Yonsel, S. y Deckwer, W. D. (1991). Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m³. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(3): 289-294.

Habe, H.; Shimada, Y.; Fukuoka, T.; Morita, T.; Kitamoto, D.; Yakushi, T.; Matsushita, K. y Sakaki, K. (2010). Disruption of the membrane-bound alcohol dehydrogenase-encoding gene improved glycerol used and dihydroxyacetone productivity in *Gluconobacter oxydans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74(1): 1391-1395.

Harden, A. y Walpole, G. S. (1906). 2,3-Butylene glycol fermentation by *Aerobacter aerogenes*. *Proceedings of Royal Society of London B*, 77: 399-405.

Himmi, E. H.; Bories, A. y Barbirato, F. (1999). Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*, 67: 123-128.

Hongwen, C.; Baishan, F. y Zongding, H. (2005). Optimization of process parameters for key enzymes accumulation of 1,3-propanediol production from *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemical Engineering Journal*, 25: 47-53.

Hu, Z.; Zheng, Y. y Shen, Y. (2011). Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, 102: 7177-7182.

Huynh DTN, Kim AY, Seol IH, Jung S, Lim MC, Lee JA, Jo MR, Choi SJ, Kim B, Lee J, Kim W, Kim YR (2015). Inactivation of virulence factor from 2,3-butanediol –producing *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22): 9427-9438.

Infinita Renovables (2015). Informe biodiésel 2015.

Ivy, J. L. (1998). Effect of pyruvate and dihydroxyacetone on metabolism and aerobic endurance capacity. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 30(6): 837-843.

Jansen, N. B.; Flickinger, M. C. y Tsao, G. T. (1984). Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(4): 362-369.

Ji, X.; Huang, H.; Zhu, J.; Ren, L.; Hu, N. y Li, S. (2009). Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. *Bioresource Technology*, 100: 3410-3414.

Ji, X.; Huang, H. y Ouyang, P. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*, 29: 351-364.

Jimenez, M. J.; Robles, A.; Macias, M. D.; Hita, E.; Esteban, L.; Gonzalez, P. A. y Molina, E. (2014). Extraction of saponifiable lipids from wet microalgal biomass for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 169: 198-205.

Johnson, D. T. y Taconi, K. A. (2007). The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environmental Progress*, 24(4): 338-348.

Johnson, E. y Rehmann, L. (2016). The role of 1,3-propanediol in fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*. *Bioresource Technology*, 209: 1-7.

Jolly, J.; Hitzmann, B.; Ramalingam, S. y Ramachandran, K. B. (2014). Biosynthesis of 1,3-propanediol from glycerol with *Lactobacillus reuteri*: Effect of operative variables. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(2): 188-194.

- Jung, M. Y.; Park, B. S.; Lee, J. y Oh, M. K. (2013).** Engineered *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of sugarcane molasses in 2,3-butanediol production. *Bioresource Technology*, 139: 21-27.
- Jurchescu, I. A.; Hamann, J.; Zhou, X.; Ortmann, T.; Kuenz, A.; Prusse, U. y Lang, S. (2013).** Enhanced 2,3-butanediol production in fed-batch cultures of free and immobilized *Bacillus licheniformis* DSM 8785. *Biotechnological Products and Process Engineering*, 97: 6715-6723.
- Kaur, G.; Srivastava, A. K. y Chand, S. (2012).** Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. *Biochemical Engineering Journal*, 64: 106-118.
- Kay, J. E. y Jewett, M. C. (2015).** Lysate of engineered *Escherichia coli* supports high-level conversion of glucose to 2,3-butanediol. *Metabolic Engineering*, 32: 133-142.
- Khanna, S.; Goyal, A. y Moholkar, V. S. (2012).** Microbial conversion of glycerol: present status and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(3): 235-262.
- Kim, D. K.; Rathnasingh, C.; Song, H.; Lee, H.J.; Seung, D. y Chang, Y. K. (2013).** Metabolic engineering of a novel *Klebsiella oxytoca* strain for enhanced 2,3-butanediol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(2): 186-192.
- Kim, Y. J.; Joo, H. W.; Park, J.; Kim, D. K.; Jeong, K. J. y Chang, Y. K. (2016)** Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella oxytoca* from various sugars in microalgal hydrolysate. *Biotechnology progress*, 31(6): 1669-1675.
- Koh, M. Y. y Ghazi, T. I. M. (2011).** A review of biodiésel production from *Jatropha curcas* L. oil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(5): 2240- 2251.
- Kongjao, S.; Damronglerd, S. y Mali, H. (2010).** Purification of crude glycerol derived from waste used-oil methyl ester plant. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 27(3): 944-949.
- Kumar, G. S.; Wee, Y.; Lee, I.; Sun, H.; Zhao, X.; Xia, S.; Kim, S.; Lee, J.; Wang, P. y Kim, J. (2015).** Stabilized glycerol dehydrogenase for the conversion of glycerol to dihydroxyacetone. *Chemical Engineering Journal*, 276: 283-288.
- Lages, F. y Lucas, C. (1997).** Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1322: 8-18.

Larsen, S. H. y Stormer, F. C. (1973). Diacetyl (acetoin) reductase from *Aerobacter aerogenes* kinetic mechanism and regulation by acetate of reversible reduction of acetoin to 2,3-butanediol. *European Journal of Biochemistry*, 34(1): 100-106.

Laube, V. M.; Groleau, D. y Martin, S.M. (1984). The effect of yeast extract on the fermentation of glucose to 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnological Letters*, 6: 535-540.

Lee, S. M.; Oh, B. R.; Park, J. M.; Yu, A.; Heo, S. Y.; Hong, W. K.; Seo, J. W. y Kim, C. H. (2014). Optimized production of 2,3-butanediol by a lactate dehydrogenase-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(6): 1210-1215.

Leoneti, A. B.; Aragao-Leoneti, V. y Oliveira, S. V. W. B. (2012). Glycerol as a by-product of biodiésel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*, 45: 138-145.

Li, M.; Wu, J.; Liu, X.; Lin, J.; Wei, D. y Chen, H. (2010a). Enhanced production of dihydroxyacetone from glycerol by overexpression of glycerol dehydrogenase in an alcohol dehydrogenase-deficient mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*, 101: 8294-8299.

Li, D.; Dai, J. Y. y Xiu, Z. L. (2010b). A novel strategy for integrated utilization of Jerusalem artichoke stalk and tuber for production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Bioresource Technology*, 101(21): 8342-8347.

Li, C.; Lesnik, K. L. y Liu, H. (2013). Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products. *Energies*, 6: 4739-4768.

Li, L.; Li, K.; Wang, K.; Chen, C.; Gao, C.; Ma, C. y Xu, P. (2014). Efficient production of 2,3-butanediol from corn stover hydrolysate by using a thermophilic *Bacillus licheniformis* strain. *Bioresource Technology*, 170: 256-261.

Lidia, S. y Stanislaw, B. (2012). Production of dihydroxyacetone from an aqueous solution of glycerol in the reaction catalyzed by an immobilized cell preparation of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* ATCC 621. *European Food Resource Technology*, 235: 1125-1132.

Liebmingner, S.; Hofbauer, R.; Siebenhofer, M.; Nyanhongo, G. S. y Guebitz, G. M. (2014). Microbial conversion of crude glycerol to dihydroxyacetone. *Waste Biomass Valor*, 5: 781-787.

Liu, H.; Zhang, D.; Xu, Y.; Mu, Y.; Sun, Y. y Xiu, Z. **(2007)**. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions up to a pilot scale. *Biotechnological Letters*, 29: 1281-1285.

Liu, Y.; Sun, Y.; Tan, C.; Li, H.; Zheng, X. ;Jin, K. y Wang, G. **(2013)**. Efficient production of dihydroxyacetone from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Gluconobacter frateurii*. *Bioresource Technology*, 142: 384-389.

Lu, L.; Wei, L.; Zhu, K.; Wei, D. y Hua, Q. **(2012)**. Combining metabolic engineering and adaptative evolution to enhance the production of dihydroxyacetone from glycerol by *Gluconobacter oxydans* in a low-cost way. *Bioresource Technology*, 117: 317-324.

Navarro, E.; Robles, A.; Gonzalez, P. A.; Esteban, L.; Martin, Lorena y Molina, E. **(2016)**. Biodiesel production from *Nannochloropsis gaditana* lipids through transesterification catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase. *Bioresource Technology*, 203: 236-244.

Neish, A. C. (1945). Production and properties of 2,3-butanediol. IV. Purity of the levorotatory 2,3-butaneidol produced by *Aerobacillus polymyxa*. *Canadian Journal of Research Section B*, 23(1): 10-16.

Neish, A. C.; Blackwood, A. C.; Robertson, F. M. y Ledingham, G. A. **(1947)**. Production and properties of 2,3-butanediol. XVIII. Dissimilation of glucose by *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Research Section B*, 25(1): 65-69.

Ma, Z.; Rao, Z. M.; Xu, L. Y.; Liao, X. R.; Fang, H. Y.; Zhuge, B. y Zhuge, H. **(2009a)**. Production of 1,3-propanediol from glycerol by engineered *Escherichia coli* using a novel co-expression vector. *African Journal of Biotechnology*, 8(20): 5500-5505.

Ma, C.; Wang, A.; Qin, J.; Li, L.; Ai, X.; Jiang, T.; Tang, H. y Xu, P. **(2009b)**. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Applied Microbiology Biotechnology*, 82:49–57.

Maddox, I.S. (2008). Microbial production of 2,3-butanediol. In: Rehm, H.J.; Pühler, A. y Stadler, P.; (eds) *Biotechnology*, 2nd Edition Wiley-VCH Verlag GmbH.

Marchetti, J. M.; Miguel, V. U. y Errazu, A. F. **(2007)**. Possible methods for biodiésel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11: 1300-1311.

Martinez-Gomez, K.; Flores, N.; Castañeda, H. M.; Martinez-Batallar, G.; Hernandez-Chavez, G.; Ramirez, O. T.; Gosset, G.; Encarnacion, S. y Bolivar, F. **(2012)**. New insights into *Escherichia coli*

metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. *Microbial Cell Factories*, 11: 46-67.

Mattam, A. J.; Clomburg, J. M.; Gonzalez, R. y Yazdani, S. S. (2013). Fermentation of glycerol and production of valuable chemical and biofuel molecules. *Biotechnological Letters*, 35: 831-842.

Metsoviti, M; Zeng, A.; Koutinas, A. A. y Papanikolau, S. (2013). Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocess. *Journal of Biotechnology*, 163: 408-418.

Misturini, D.; Aquino, E.; Hickmann, S. y Zachia, M. A. (2013). Conversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Renewable Energy*, 55: 404-409.

Moon, C.; Lee, C. H.; Sang, B. I. y Um, Y. (2011). Optimization of medium compositions favoring butanol and 1,3-propanediol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum*. *Bioresource Technology*, 102(22): 10561-10568.

Murarka, A.; Dharmadi, Y.; Yazdani, D. D. y Gonzalez, R. (2008). Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 1124-1135.

Nakashimada, Y.; Kanai, K. y Nishio, N. (1998). Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2,3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. *Biotechnology Letters*, 20(12): 1133-1138.

Niknahad, H. y O'Brien, P. J. (1996). Antidotal effect of dihydroxyacetone against cyanide toxicity in vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 138(1): 186-191.

Niknahad, H. y Ghelichkhani, E. (2002). Antagonism of cyanide poisoning by dihydroxyacetone. *Toxicological Letters*, 132(2): 95-100.

Oh, B.; Seo, J.; Heo, S.; Hong, W.; Luo, L. H.; Kim, S.; Park, D. y Kim, C. H. (2012). Optimization of culture conditions for 1,3-propanediol production from glycerol using a mutant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166: 127-137.

Okoye, P. U. y Hameed, B. H. (2016). Review on recent progress in catalytic carboxylation and acetylation of glycerol as byproduct of biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 53: 558-574.

Pagliari, M.; Ciriminna, R.; Kimura, H.; Rossi, M. y Pina, C. D. (2007). From glycerol to value-added products. *Angewandte Chemie International Edition*, 46: 4434-4440.

Palmqvist, E. y Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74: 25-33.

Papanikolau, S.; Rontou, M.; Belka, A.; Athenaki, M.; Gardeli, C.; Mallouchos, A.; Kalantzi, O.; Koutinas, A. A.; Kookos, I. K.; Zeng, A. y Aggelis, G. (2016). Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. *Engineering in Life Sciences*, Accepted Article.

Petrov, K. y Petrova, P. (2009). High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Biotechnological Products and Process engineering*, 84: 659 – 665.

Petrov, K. y Petrova, P. (2010). Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 943-949.

Posada, J. A. y Cardona, C. A. (2010). Design and analysis of fuel ethanol production from raw glycerol. *Energy*, 35: 5286-5293.

Priya, A.; Dureja, P.; Talukdar, P.; Rathi, R.; Lal, B. y Sarma, P. M. (2016). Microbial production of 2,3-butanediol through a two-stage pH and agitation strategy in 150 L bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 105: 159-167.

Przystalowska, H.; Lipinski, D. y Slomski, R. (2015). Biotechnological conversion of glycerol from biofuels to 1,3-propanediol using *Escherichia coli*. *Acta Biochimica Polonica*, 62(1): 23-34.

Qin, J. Y.; Xiao, Z. J.; Ma, C. Q.; Xie, N. Z.; Liu, P. H. y Xu, P. (2006). Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glucose and ammonium phosphate. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 14(1): 132-136.

Rajatanavin, N.; Suwanachote, S. y Kulkollakarn, S. (2008). Dihydroxyacetone: a safe camouflaging option in vitiligo. *International Journal of Dermatology*, 47(4): 402-406.

Rathnasingh, C.; Park, J.M.; Kim, D.K.; Song, H. y Chang, Y.K. (2016). Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* and in silico investigation for enhanced 2,3-butanediol production. *Biotechnology Letters*, 38(6): 975-982.

Rifkin, J. (2008). The third industrial revolution. *Engineering & Technology*, 26 April- 8May: 26-27.

Rocha-Martin, J.; Acosta, A.; Berenguer, J.; Guisan, J. M. y Lopez-Gallego, F. (2014). Selective oxidation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone by covalently immobilized glycerol dehydrogenases with higher stability and lower product inhibition. *Bioresource Technology*, 170: 445-453.

Rodriguez, A.; Wojtusik, M.; Ripoll, V.; Santos, V. E. y Garcia-Ochoa, F. (2016). 1,3-propanediol production from glycerol with a novel biocatalyst *Shimwellia blattae* ATCC 33430: operational conditions and kinetics in batch cultivations. *Bioresource Technology*, 200: 830-837.

Sarma, S. J.; Brar, S. K.; Sydney, E. B.; Bihan, Y. L.; Buelna, G. y Soccol, C. R. (2012). Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: a review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 6473-6490.

Saxena, R. K.; Anand, P.;Saran, S. e Isar, J. (2009). Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, 27: 895-913.

Stelmachowski, M. (2011). Utilization of glycerol, a by-product of the transesterification process of vegetable oils: a review. *Ecological Chemistry and Engineering*, 18(1): 9-30.

Schindler, B. D.; Joshi, R. V.; Vieille, C. (2014).Respiratory glycerol metabolism of *Actinobacillus succinogenes* 130Z for succinate production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41: 1339-1352.

Schuchardt, U.; Sercheli, R. y Vargas, R. M. (1998). Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 9(1): 199-210.

Stanko, R. T.; Robertson, R. J.; Spina, R. J.; Reilly, J. J. Jr.; Greenawalt, K. D: y Goss, F. L. (1990). Enhancement of arm exercise endurance capacity with dihydroxyacetone and pyruvate. *Journal of Applied Physiology*, 68(1): 119-124.

Sun, L.H.; Wang, X.D.; Dai, J.Y. y Xiu, Z.L. (2009). Microbial production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 82:847–852.

Szymanowska-Powalowska, D. (2014). 1,3-Propanediol production from crude glycerol by *Clostridium butyricum*DSP1 in repeated batch. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17: 322-328.

Szymanowska-Powalowska, D. y Bialas, W. (2014). Scale-up of anaerobic 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*DSP1 from crude glycerol. *BMC Microbiology*, 14: 45-55.

Taguchi, G. (1978). Performance analysis design. *International Journal of Research*, 16(6): 521-530.

Talebian-Kiakalaieh, A.; Amin, N. A. S. y Hezaveh, H. (2014). Glycerol for renewable acrolein production by catalytic dehydration. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 40: 28-59.

Tan, H. W.; Aziz, A. R. A. y Aroua, M. K. (2013). Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27: 118-127.

Tang, X. M.; Tan, Y. S.; Zhu, H.; Zhao, K. y Shen, W. (2009). Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineering strain of *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, 75: 1628-1634.

Teng, W. K.; Ngoh, G. C.; Yusoff, R. y Aroua, M. K. (2014). A review on the performance of glycerol carbonate production via catalytic transesterification: Effects of influencing parameters. *Energy Conversion and Management*, 88: 484-497.

Vieira, P. B.; Kilikian, B. V.; Bastos, R. V.; Perpetuo, E. A. y Nascimento, C. A. O. (2015). Process strategies for enhanced production of 1,3-propanediol by *Lactobacillus reutei* using glycerol as a co-substrate. *Biochemical Engineering Journal*, 94: 30-38.

Villet, R. (1981). Biotechnology for producing chemicals from biomass. Vol. 2, Fermentation chemicals from biomass. Department of Energy, Solar Energy Research Institute, Golden, Colorado.

Voloch, M.; Jansen, N.; Ladisch, M.; Tsao, G.; Narayan, R. y Rodwell, V. (1985) 2,3-Butanediol. Comprehensive Biotechnology. Section 3: Industrial Chemicals, Biochemicals and Fuels, 933-947. Ed. Pergamon.

Walpole, G. S. (1911). The action of *Bacillus lactisaerogenes* on glucose and mannitol Part II - The investigation of the 2 3 butanediol and the acetylmethylcarbinol formed, the effect of free oxygen on their production, the action of *B. lactisaerogenes* on fructose. *Proceedings of Royal Society of London B*, 83(564): 272-286.

Wang, F. H.; Qu, H. J.; Zhang, D. W.; Tian, P. F. y Tan, T. W. (2007). Production of 1,3-propanediol from glycerol by recombinant *E.coli* using incompatible plasmids system. *Molecular Biotechnology*, 37(2): 112-119.

Wang, A.; Wang, Y.; Jiang, T.; Li, L.; Ma, C. y Xu, P. **(2010)**. Production of 2,3-butanediol from corncob molasses, a wasteby-product in xylitol production. *Applied Microbiology Biotechnology*, 87:965–970.

Wang, Y.; Tao, F. y Xu., P. **(2014)**. Glycerol dehydrogenase plays a dual role in glycerol metabolism and 2,3-butanediol formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(9): 6080-6090.

Wang, X. X.; Hu, H. Y.; Liu, D. H. y Song, Y. Q. **(2016)**. The implementation of high fermentative 2,3-butanediol production from xylose by simultaneous additions of yeast extract, Na₂EDTA, and acetic acid. *New Biotechnology*, 33(1): 16-22.

Werpy, T. y Petersen, G. (2004). Top value added chemicals from biomass. Volume I -Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas Pacific Northwest National Laboratory. National Renewable Energy Laboratory. U. S. Department of Energy.

Wilken, T. y Vorlop, K. D. (2004). Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Applied Microbial Biotechnology*, 66: 131-142.

Wilkens, E.; Ringel., A. K.; Hortig, D.; Wilke, T. y Vorlop, K. **(2012)**. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. *Biotechnological Products and Process Engineering*, 93: 1057-1063.

Xiao, Z. y Xu, P. (2007). Acetoin metabolism in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(2): 127-140.

Xie, N. Z. ; Li, J. X.; Song, L. F.; Hou, J. F.; Guo, L.; Du, Q. S.; Yu, B. y Huang, R. B. **(2015)**. Genome sequence of type strain *Paenibacillus polymyxa* DSM 365, a highly efficient producer of optically active (*R, R*)-2,3-butanediol. *Journal of Biotechnology*, 195: 72-73.

Xin, F.; Basu, A.; Weng, M. C.; Yang, K. L. y He, J. **(2016)**. Production of 2,3-butanediol from sucrose by a *Klebsiella* species. *Bioenergy Resource*, 9: 15-22.

Xu, Y. Z.;Guo, N. N.; Zheng, Z. M.; Ou, X. J.; Liu, H. J. y Liu, D. H. **(2009)**. Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 104: 965-972.

Yang, G.; Tian, J. y Li, J. **(2007)**. Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(5): 1017-1024.

- Yang, T. W.; Rao, Z. M.; Zhang, X.; Lin, Q.; Xia, H. F.; Xu, Z. H. y Yang, S. T. (2011).** Production of 2,3-butanediol from glucose by GRAS microorganism *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Basic Microbiology*, 51(6): 650-658.
- Yang, T.; Rao, Z.; Zhang, X.; Xu, M.; Xu, Z. y Yang, S. (2013).** Fermentation of biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*: effects of co-substrates on 2,3-butanediol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 7651-7658.
- Yang, T.; Rao, Z.; Zhang, X.; Xu, M.; Xu, Z. y Yang, S. (2015).** Enhanced 2,3-butanediol production from biodiesel-derived by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbial cell factories* 14: 122-133.
- Yen, H.; Li, F. y Chang, J. (2014).** The effects of dissolved oxygen level on the distribution of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol produced from glycerol by an isolated indigenous *Klebsiella* sp. Ana-WS5. *Bioresource Technology* 153: 374-378.
- Yu, E. K. y Sadler, J. N. (1982).** Enhanced production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid. *Applied Environmental Microbiology*, 44: 777-784.
- Yu, K. O.; Kim, S. W. y Han, S. O. (2010).** Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 101: 4157-4161.
- Zeng, A.; Blieb, H. y Deckwer, W. (1990).** 2,3-butanediol production by *Enterobacter aerogenes* in continuous culture: role of oxygen supply. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33(3): 264-268.
- Zeng, A. P.; Byun, T. G.; Posten, C. y Deckwer, W. D. (1994).** Use of respiratory quotient as a control parameter for optimum oxygen supply and scale-up of 2,3-butanediol production under microaerobic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 1107-1114.
- Zeng, A. P. (1996).** Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Bioprocess Engineering*, 14(4): 169-175.
- Zeng, A. y Sabra, (2011).** Microbial production of diols as platform chemicals: recent progresses. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 749-757.
- Zeuthen, T. y Klaerke, D. A. (1999).** Transport of water and glycerol In Aquaporin 3 is gated by H⁺. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(31): 21631-21636.

Zhang, X.; Bao, T.; Rao, Z.; Yang, T.; Xu, Z.; Yang, S. y Li, H. **(2014)**. Two-Stage pH control strategy based on the pH preference of acetoin reductase regulates acetoin and 2,3-butanediol distribution in *Bacillus subtilis*. *PLOS one*, 9(3): 1-9.

Zhang, L. Y.; Guo, Z. W.; Chen, J. B.; Xu, Q. M.; Lin, H.; Hu, K. H.; Guan, X. y Shen, Y. L. **(2016)**. Mechanism of 2,3-butanediol stereoisomers formation in a newly isolated *Serratia* sp T241. *Scientific Reports*, 6: 19257-19269.

Zhao, Y.; Chen, G. y Yao, S. **(2006)**. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemical Engineering Journal*, 32: 93-99.

Zheng, M. Q. y Zhang, S. P. (2011). Immobilization of glycerol dehydrogenase on magnetic silica nanoparticles for conversion of glycerol to value-added 1,3-dihydroxyacetone. *Biocatalyst and Biotransformation*, 29(6): 278-287.

Zheng, X.; Jin, K.; Zhang, L.; Wang, G. y Liu, Y. **(2016)**. Effects of oxygen transfer coefficient on dihydroxyacetone production from crude glycerol. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47: 129-135.

Zhou, C.; Beltramini, J. N.; Fan, Y. y Lu, G. Q. **(2008)**. Chemoselective catalytic conversión of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. *Chemical Society Reviews*, 37: 527-549.

CAPÍTULO 2

PARTE EXPERIMENTAL

Para la realización de la investigación que constituye la presente Tesis Doctoral, se ha requerido el empleo de distintos materiales y equipos así como el desarrollo de procedimientos experimentales, la utilización y puesta a punto de diversas técnicas analíticas y el uso de distintos recursos matemáticos. En el presente Capítulo se recoge la información sobre los materiales y métodos empleados para el desarrollo de este trabajo.

2.1 MATERIALES EMPLEADOS

En el presente Apartado se describen los aspectos relacionados con los microorganismos, reactivos y medios empleados para el desarrollo de la parte experimental.

2.1.1 MICROORGANISMOS

Los microorganismos empleados como biocatalizador del proceso de producción de 2,3-BD a partir de glicerina son cepas pertenecientes al género *Raoultella*, proporcionadas por la empresa Biopolis, S. L. Dos cepas diferentes han sido objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral: *Raoultella planticola* CECT 843 y *Raoultella terrigena* CECT 4519. Según la clasificación de la Colección Española de Cultivos Tipo en materia de seguridad biológica ambas cepas pertenecen al grupo 1 de Riesgo Biológico, caracterizado por su carácter no patógeno para el ser humano.

El género *Raoultella* pertenece a la familia de *Enterobacteriaceae*. En términos filogenéticos, este género se encuentra muy cerca del género *Klebsiella*, siendo dificultosa la

diferenciación de ambos géneros en muchos laboratorios clínicos de microbiología (Drancourt y col., 2001; Shaikh y Morgan, 2011). El aislamiento de las cepas de *Raoultella* procede de muestras de suelo y agua, por lo que resulta característico de éstas su capacidad de crecimiento a 10 °C.

Las especies clasificadas dentro del género *Raoultella* presentan las siguientes características comunes: bacterias gram-negativas, oxidasa-negativas, catalasa-positivas, aerobias, sin movilidad y con una prominente cápsula de polisacáridos. Pueden actuar también como microorganismos anaerobios facultativos, dado que presentan tanto respiración como rutas metabólicas fermentativas. *Raoultella* spp. proporcionan una respuesta positiva al test Volger-Proskauer, ensayo empleado para detectar acetoina en el caldo de cultivo. La acetoina es el precursor de la biosíntesis 2,3-BD, por lo que esta característica del metabolismo de *Raoultella* deja de manifiesto la capacidad de las cepas estudiadas para la producción del compuesto de interés en esta investigación.

2.1.2 REACTIVOS

En este Apartado se enumeran los reactivos comerciales empleados para el desarrollo de la parte experimental de la presente Tesis Doctoral. Cabe destacar que todos los reactivos requeridos son comercializados por diferentes compañías, a excepción del glicerol crudo. Las muestras de glicerol crudo son suministradas por la empresa española Biocom, Energía S. L., que gestiona el funcionamiento de una planta de producción de biodiésel.

En la Tabla 2.1 se recoge el listado de los reactivos empleados para el desarrollo del método analítico de la determinación de la composición del caldo de cultivo y su calibrado. En la Tabla 2.2 se incluyen todos los reactivos necesarios para la formulación de los distintos medios de cultivo requeridos para el mantenimiento celular, la obtención del biocatalizador y los ensayos de producción de 2,3-BD.

La composición de las muestras de glicerol crudo recibidas a lo largo del trabajo experimental realizado es variable y es necesaria la cuantificación de los compuestos presentes en el residuo previamente a su uso. Para su empleo se ha llevado a cabo en primer lugar a una centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min para separar el residuo que sobrenada sobre el seno de la fracción principal que contiene la glicerina. Además, es necesario el siguiente pretratamiento: burbujeo de aire en vitrina durante 30 min para eliminar cualquier resto de metanol que contenga, debido al carácter tóxico que tiene para el crecimiento microbiano.

Tabla 2.1 Reactivos empleados para la elaboración del calibrado para el desarrollo del método analítico para la determinación de la composición del caldo de cultivo.

COMPUESTO	Marca	Pureza (%)	Código
(2R, 3R)-(-)-2,3-butanodiol	Sigma-Aldrich	97	237639
(2S, 3S)-(+)-2,3-butanodiol	Sigma-Aldrich	97	300349
meso-2,3-butanodiol	Sigma-Aldrich	99	361461
Acetoína	Sigma-Aldrich	>96	W200808
Ácido acético glacial	Sigma-Aldrich	99,99	338826
Ácido láctico	Sigma-Aldrich	>85	252476
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich	95-98	320501
Etanol	Sigma-Aldrich	>99,8	02860
Glicerol	Sigma-Aldrich	>99,5	G9012

Tabla 2.2 Reactivos empleados para la formulación de los distintos medios de cultivo, el medio de conservación celular y las disoluciones tampón empleadas.

COMPUESTO	Marca	Pureza (%)	Código
Glicerol	Sigma-Aldrich	>99,5	G9012
Ácido cítrico	Sigma-Aldrich	>99,5	251275
Extracto de Levadura	Sigma-Aldrich	-	Y1625
NaCl	Sigma-Aldrich	>99	793566
KCl	Sigma-Aldrich	>99	793590
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Sigma-Aldrich	>99	71500
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	>99	795410
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich	>99	A4418
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	>99	795488
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma-Aldrich	>99	63140
ZnCl ₂	Sigma-Aldrich	>97	746355
FeCl ₃ ·6H ₂ O	Sigma-Aldrich	>97	236489
MnCl ₂ ·4H ₂ O	Sigma-Aldrich	99,99	203734
CuCl ₂ ·2H ₂ O	Sigma-Aldrich	>99	307483
H ₃ BO ₃	Sigma-Aldrich	>99,5	B6768
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich	>99,5	A9434
CaCl ₂	Sigma-Aldrich	>97	746495
2-amino-2-hidroximetil -propano -1,3-diol (TRIS)	Sigma-Aldrich	-	TRIS-RO

El análisis de la composición de la glicerina cruda fue puesto a punto por el Grupo de Investigación de *Fisicoquímica de los Procesos Industriales y Medioambientales* de la Universidad Complutense de Madrid (UCM-190143), donde se enmarca esta investigación. Para ello se requirió la puesta a punto de distintas técnicas instrumentales, tales como cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía iónica, termogravimetría y volumetría de Karl-Fisher. Fruto de estos análisis se conoció la composición de las muestras recibidas, que se encuentra detallada en la Tabla 2.3. La riqueza en glicerol de todas las muestras recibidas se encuentra entre el 55 y 88 g/L, a excepción de la muestra 2 que contiene únicamente 35 g/L. Además, esta muestra es la que presenta mayor contenido de otros compuestos como ésteres metílicos de ácidos grasos y monoglicéridos. Por ello, esta muestra fue desechada para los ensayos de producción de 2,3-BD, debido a que podría dar lugar a resultados no comparables con las otras muestras. Cabe destacar que todas las muestras presentan gran contenido en cloruros y fosfatos, principal diferencia del sustrato crudo con respecto a la glicerina pura. Este hecho debe ser tenido en cuenta en el análisis de los resultados cuando se compare el comportamiento del sistema con ambos sustratos carbonados.

Tabla 2.3 Composición de las muestras de glicerol crudo empleadas como sustrato carbonado.

COMPUESTO	MUESTRA					
	1	2	3	4	5	6
Glicerol (g/L)	88	35	55	55	85	68
Agua (%p/p)	2,0	1,2	1,8	45,0	3,0	32,5
Ésteres metílicos de ácidos grasos (%p/p)	-	20	5	-	-	-
Ácidos grasos libres (% p/p)	-	5	3	-	-	-
Monoglicéridos (%p/p)	-	24	16	-	-	-
Diglicéridos (% p/p)	-	1	-	-	-	-
Jabones (%p/p)	-	5	3	-	-	-
Cenizas (% p/p)	10	5	8	5	12	5
Cloruros (g/L)	33,7	22,7	24,6	17,3	56,6	44,1
Fosfatos (g/L)	5,2	4,1	4,5	2,5	6,1	3,7

2.1.3 COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS EMPLEADOS

En este Apartado se describe la composición de los distintos medios empleados en las etapas de conservación, crecimiento del biocatalizador y ensayos de producción de 2,3-BD. En la Tabla 2.4 se incluye la composición del medio requerido para la conservación celular del *stock* concentrado congelado. En las Tablas 2.5 y 2.6 se adjunta la composición de los medios de cultivo para el crecimiento celular. Por último, en la Tabla 2.7 se muestra la composición de los tampones biológicos empleados para el estudio de producción de 2,3-BD con células en estado de *resting cells*, para las diferentes fortalezas estudiadas. Cabe destacar que el pH de los tampones biológicos debe ser ajustado previamente a su uso. Para ello, se emplean disoluciones de HCl 2M y NaOH 2M.

Tabla 2.4 Composición del medio de conservación celular para el *stock* concentrado.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (g/L)
Glicerol	500,0
NaCl	4,5

Tabla 2.5 Composición del medio de cultivo 1.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (g/L)
KCl	0,75
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1,38
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,35
KH ₂ PO ₄	0,28
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,26
Ácido cítrico	0,42
Extracto de Levadura	2,00
Glicerol	30,00
DISOLUCIÓN DE MICROELEMENTOS	0,3 mL/L
ZnCl ₂	34,30
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2,70
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10,00
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,85
H ₃ BO ₃	0,31

Tabla 2.7 Composición del medio de cultivo 2.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (g/L)
NH ₄ Cl	2,00
NaCl	1,00
Na ₂ HPO ₄	12,00
KH ₂ PO ₄	6,00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25
CaCl ₂	0,01
Extracto de Levadura	1,50
Glicerol	30,00

Tabla 2.8 Composición de las disoluciones tampón empleadas para los ensayos de resting cells.

TAMPÓN	pH	FORTALEZA	COMPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN (g/L)
CITRATO	4,8	25 mM	Ácido cítrico / NaCl	4,80 / 9,00
		50 mM	Ácido cítrico / NaCl	9,61 / 9,00
		75 mM	Ácido cítrico / NaCl	14,41 / 9,00
		100 mM	Ácido cítrico / NaCl	19,21 / 9,00
FOSFATO	7,0	25 mM	KH ₂ PO ₄ / NaCl	3,40 / 9,00
		50 mM	KH ₂ PO ₄ / NaCl	6,80 / 9,00
		75 mM	KH ₂ PO ₄ / NaCl	10,21 / 9,00
		100 mM	KH ₂ PO ₄ / NaCl	13,61 / 9,00
TRIS	8,0	25 mM	TRIS / NaCl	3,03 / 9,00
		50 mM	TRIS / NaCl	6,06 / 9,00
		75 mM	TRIS / NaCl	9,09 / 9,00
		100 mM	TRIS / NaCl	12,11 / 9,00

2.2 EQUIPOS

El presente Apartado se detalla las características técnicas de los equipos requeridos para llevar a cabo la experimentación incluida en la presente Memoria. Los equipos han sido clasificados en función de la finalidad de su uso, distinguiéndose así en aquellos necesarios para

asegurar condiciones de esterilidad, equipos requeridos para el mantenimiento y crecimiento celular, equipos de medida y análisis y otros equipos auxiliares.

2.2.1 EQUIPOS REQUERIDOS PARA ASEGURAR LA ESTERILIDAD DE LOS MATERIALES

Autoclave

La esterilización de los materiales, medios y equipos empleados se lleva a cabo en un autoclave de la marca JP SELECTA, modelo Presoclave II 80, cuyo rango de temperatura y presión de trabajo es de 80 a 134 °C y 0,62 a 2 bar, respectivamente, y 80 L de capacidad.

Cabina de flujo laminar

La atmósfera estéril adecuada para llevar a cabo la manipulación del microorganismo sin peligro de contaminación del mismo se consigue mediante el trabajo en el interior de una cabina de flujo laminar de la marca TELSTAR, modelo Micro-V/PCR, capaz de alcanzar una velocidad de impulsión de hasta 0,45 m/s gracias al impulsor de aire del que dispone. Las condiciones de esterilidad se logran gracias al filtro de aspiración y el filtro absoluto HEPA, que impiden la entrada de microorganismos del exterior al interior de la cámara. Además dispone una lámpara de luz ultravioleta en el interior.

2.2.2 EQUIPOS REQUERIDOS PARA EL MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS

Ultracongelador

Para la conservación a largo plazo del microorganismo en *stocks*, se utilizó un congelador de la casa SANYO, modelo VIP, serie MDF-U33V. Se trata de un congelador de ultra baja temperatura de 333 L de capacidad, que ofrece la posibilidad de mantener la temperatura en su interior en el intervalo entre -50 y -86 °C.

Estufa de cultivo

Para el cultivo del microorganismo en medio sólido, se requirió el empleo de la estufa de cultivo bacteriológica de convección natural de la marca HERAEUS, de la serie Function Line. Dispone de un sistema de control de temperatura en el intervalo entre 5 y 70 °C, con una estabilidad menor o igual a ± 1 °C en el espacio y menor o igual a $\pm 0,2$ °C en el tiempo a 37 °C.

Incubadora orbital

Las etapas de crecimiento del biocatalizador así como parte de los estudios posteriores de producción de 2,3-BD se llevaron a cabo en botellas cilíndricas de 50 y 100 mL y matraces *Erlenmeyer* troncocónicos de 250 mL de borosilicato. Estos biorreactores son ampliamente

utilizados en las primeras etapas de desarrollo de bioprocesos debido a su bajo coste, fácil manejo y sencillez experimental.

Para el control de las condiciones de operación, temperatura y velocidad de agitación, se hizo uso de una incubadora orbital de la marca GALLENKAMP, modelo INR-200. Dispone de un sistema de control de temperatura entre 5 y 70 °C, con una fluctuación de $\pm 0,1$ °C en su interior y un intervalo de velocidad de agitación entre 0 y 400 rpm, con un radio orbital de 32 mm y capacidad para 30 matraces *Erlenmeyer* de 250 mL.

Biorreactor

Los experimentos de producción de 2,3-butanodiol con *Raoultella terrigena* CECT 4519, se llevaron a cabo en fermentadores comercializados por Sartorius BBI Systems. Se empleó el modelo BIOSTAT® B plus, que corresponde a un biorreactor de tipo tanque agitado, constituido por una cuba de cultivo y una unidad con sistema de medida, control y regulación de pH, temperatura, velocidad de agitación y concentración de oxígeno disuelto en el caldo, que se realiza a través del software MFCS/WIN 3. Las partes principales de este dispositivo experimental se detallan a continuación.

- **Cuba de cultivo.** Está construida en vidrio de borosilicato. Se dispone de dos tamaños distintos de cubas, de 3 L de volumen total (2 L de volumen máximo de trabajo) y 1,5 L de volumen total (1 L de volumen de trabajo). Está formada por una doble pared de vidrio y una tapa de acero inoxidable, provista de orificios de diferentes diámetros para la conexión de sondas que permitan el control de variables, del condensador, la membrana de inoculación y las conexiones con otros recipientes. En la Figura 2.1 se puede apreciar un esquema del tanque de cultivo, en vista lateral y superior.
- **Sistema de medida y control de la temperatura.** La velocidad de agitación en el biorreactor se regula mediante un controlador digital PID ajustando la velocidad a través de un motor de 180 W de potencia máxima, que ejerce su acción sobre una varilla de acero inoxidable, sobre la que se encuentran dos agitadores de turbina de seis palas planas. La velocidad de agitación se mide con un tacómetro ajustable entre 0 y 2000 rpm, con una resolución de ± 10 rpm.

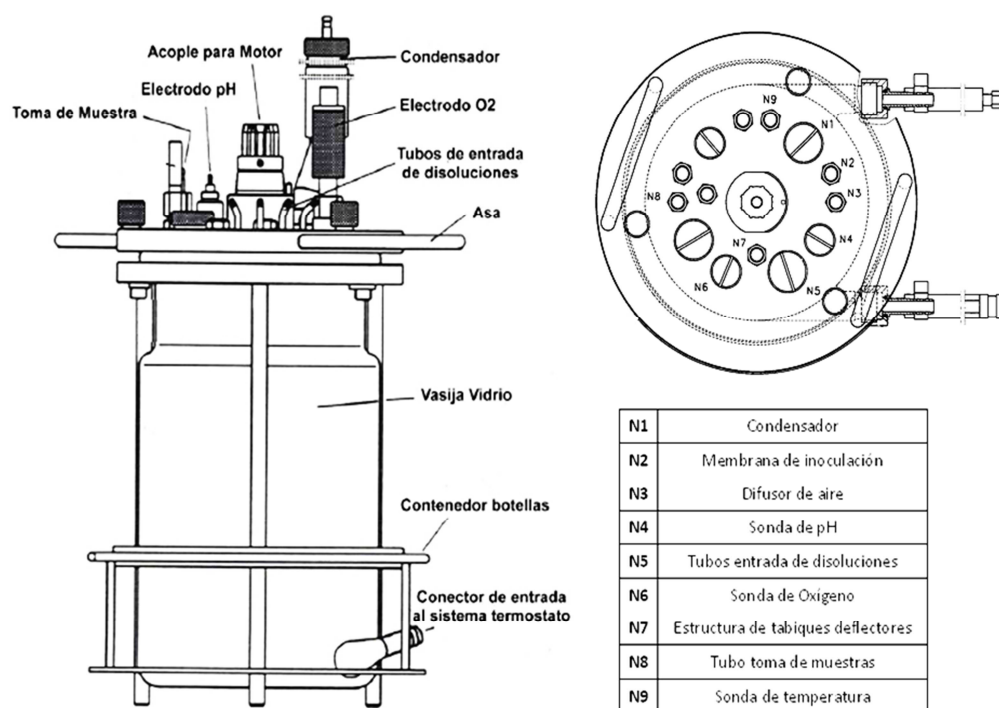


Figura 2.1 Biorreactor BIOSTAT B Plus: Esquema del tanque de cultivo, vista lateral y planta.

- **Sistema de control del caudal del gas de entrada.** La aireación de la cuba se consigue suministrando aire, por burbujeo, mediante un compresor, filtrándose a través de un filtro que posee una membrana de 0,2 μm , con el fin de conseguir la esterilización del aire introducido en el reactor. El aire se distribuye en el interior mediante un difusor toroidal. Su caudal es controlado mediante un sistema micro-DCU. Para el control de la velocidad del caudal de aire se utiliza un controlador de caudal másico. El controlador de caudal permite también la mezcla de dos gases (usualmente aire y oxígeno), de forma que se puede regular automáticamente la concentración de oxígeno disuelto en el medio líquido.
- **Sistema de medida y control del pH.** Se realiza también con un controlador digital PID que actúa sobre las bombas de alimentación de ácido y de base en función de la señal de medida, previamente amplificada. Se utiliza un electrodo Hamilton, cuyo intervalo de medida varía entre 2 y 12 unidades de pH. La calibración se realiza con un sensor digital.
- **Sistema de medida y control del oxígeno disuelto.** La medida del oxígeno disuelto se realiza empleando un electrodo esterilizable, fabricado por Hamilton. Este electrodo funciona mediante el principio de polarización y consta de un ánodo de plata y un cátodo de platino (en una solución de cloruro de potasio) separados del medio de cultivo

por una membrana de teflón permeable al oxígeno. Opera en un intervalo de medida de entre 0 y 100% de saturación, disponiendo de una compensación de temperatura automática. La señal de medida es amplificada y convertida en una señal digital. La concentración de oxígeno disuelto, por su parte, puede ser controlada mediante la acción sobre el caudal de aire y/o bien mediante la velocidad de agitación, con un controlador PID en cascada.

- **Sistema de medida del oxígeno y dióxido de carbono en la corriente de salida.** La composición del gas de salida del fermentador se realiza mediante la medida *online* proporcionada por un analizador de gases. El intervalo de concentración de oxígeno que puede ser medido se encuentra entre 1-50% y para el dióxido de carbono 0-10%, con una precisión de 0,2%. Las medidas incluyen una compensación automática por la humedad y la presión. Durante el experimento, las medidas se registran cada 30 min.

2.2.3 EQUIPOS DE MEDIDA Y ANÁLISIS

Balanza de precisión

Para la cuantificación del peso de los distintos compuestos empleados se ha utilizado una balanza de precisión de la firma SARTORIUS, modelo Handy, cuya precisión es $\pm 0,1$ mg.

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPCL)

El análisis y cuantificación de la composición de las muestras del caldo de cultivo se realiza en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) de la marca AGILENT, modelo Agilent Series 1100. Este equipo dispone de distintos módulos, cuya descripción técnica se enumera a continuación.

- **Desgasificador.** Elimina las posibles burbujas de los canales de los eluyentes.
- **Bomba cuaternaria.** Módulo encargado de proporcionar el caudal programado de eluyente. Permite generar gradientes de composición y caudal a partir a los cuatro canales que presenta. Dispone de una válvula de purga para cebar la cabeza de la válvula.
- **Sistema de inyección automático.** Este módulo consta de una bandeja portaviales, un brazo automático encargado de transportar el vial en el orden programado hasta la zona de inyección, en la que la jeringa extrae una cantidad de muestra y la introduce en una válvula de seis vías donde se mezcla con la fase móvil.
- **Compartimento de columna.** Se trata de un compartimento termostatzado en el que se conecta la columna a través de la cual fluye la fase móvil.

- **Detector UV-diodo de array.** Este detector permite obtener el espectro de absorción de la muestra en función de la longitud de onda (en un intervalo comprendido en el espectro UV Vis) y del tiempo. Para ello, el módulo consta de una lámpara de deuterio cuya radiación se hace pasar a través de la muestra. La radiación emergente de la célula de flujo se dispersa a través de una red de dispersión halográfica en radiaciones monocromáticas que se focalizan sobre un conjunto de fotodiodos.
- **Detector de índice de refracción.** Este detector determina la diferencia entre la desviación de un haz de luz del líquido de la celda de la muestra y la de referencia, medida realizada a través la señal que alcanza el fotorreceptor, provisto de dos diodos, cada uno de los cuales produce una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de luz que recibe.
- **Control del equipo.** El equipo de HPLC está controlado por un ordenador a través del software *Agilent ChemStation®* de Agilent Technologies, a través del cual se pueden ejecutar acciones con las siguientes finalidades:
 - Definición del método de análisis, a través de la especificación de todas las variables (caudal y composición de la fase móvil, volumen de inyección de la muestra, temperatura del horno, etc.).
 - Adquisición y almacenamiento de datos.
 - Analizar los datos obtenidos mediante sistemas de integración de áreas de los picos cromatográficos y generación de informes con los resultados de los cromatogramas obtenidos.
 - Realizar tareas de verificación y diagnóstico del funcionamiento del equipo.
 - Sintonizar el cromatógrafo para su calibrado y la adquisición de datos.

pHmetro

Para la medida del pH de las muestras y el ajuste del mismo en las disoluciones tampón empleadas, se ha hecho uso de un electrodo de pH de la marca CRISON, modelo BASIC 20, que consta de un electrodo de cuerpo de cristal cuyo intervalo de medida es de -2,00 a 16,00 unidades de pH. El error de la medida es de $\pm 0,01$ unidades de pH.

Espectrofotómetro de absorción UV/VIS

La medida de la absorbancia de las muestras se ha realizado en un espectrofotómetro UV/VIS de la marca SHIMADZU, modelo UV1603, cuyas características técnicas son las siguientes:

- Intervalo de medida de longitud de onda: 190-1100 nm.
- Anchura de banda espectral: 2 nm.
- Lámpara de Deuterio (D2): fuente de luz para el intervalo de longitudes de onda ultravioleta.
- Lámpara Halógena de Tungsteno (WI): fuente de luz para el intervalo de longitudes de onda del visible y el infrarrojo próximo.

2.2.4 EQUIPOS AUXILIARES

Centrífuga

Para la centrifugación de las muestras y la recuperación de la biomasa para la preparación del stock y el biocatalizador compuesto por células en estado de resting cells, se ha hecho uso de una centrífuga de la marca SIGMA, modelo 4-16K. Las características técnicas de la misma son las siguientes:

- Rotores disponibles:
 - Rotor de botes 6 x 250 mL, con una velocidad máxima de giro de 9.000 rpm.
 - Accesorio para tubos 6 x 60 mL, con una velocidad máxima de giro de 9.000 rpm.
 - Rotor de tubos *Eppendorf* 30 x 1,5 mL, con una velocidad máxima de giro de 15.000 rpm.
- Velocidad máxima de giro: 15.000 rpm.
- Intervalo de control de temperatura: -20 a 70 °C.

Estufa de secado

Para el secado del material se ha empleado una estufa de la firma SELECTA, modelo S-202, que cuenta con un termómetro de referencia, un termostato de regulación de la temperatura y un termostato de seguridad. La temperatura se puede regular en un intervalo de 40 a 200 °C, con una estabilidad de $\pm 0,5\%$.

Sistema de purificación de agua

Para la preparación de todas las disoluciones y la formulación de los medios de cultivo empleados, se ha utilizado agua desionizada, proveniente de un sistema de purificación de agua de la marca SARTORIUS, modelo Arium 611UV, que permite obtener agua tipo ASTM I, cuyas características son: límite superior de resistividad 18,2 M Ω ·cm a 25 °C, carbono orgánico total menor a 1 ppb y contaminación bacteriana menor de 1 UFC/100 mL. El proceso de purificación consiste en el paso de la corriente de agua a través de dos cartuchos de carbón activo y su radiación con una lámpara UV.

2.3 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

En este Apartado se describen los procedimientos experimentales desarrollados para el trabajo en condiciones estériles, mantenimiento, manipulación y crecimiento de los microorganismos y el desarrollo de los ensayos de producción de 2,3-BD empleando tanto biocatalizadores compuestos por células en crecimiento como en estado de *resting cells*.

2.3.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA ALCANZAR CONDICIONES ESTÉRILES

Todas las etapas del proceso, que incluyen tanto la conservación y obtención del biocatalizador como los ensayos de producción de 2,3-BD, deben llevarse a cabo en condiciones de esterilidad para asegurar resultados reproducibles. De tal forma que tanto el material como los medios de cultivo involucrados en cada una de las etapas debe haber sido esterilizado previamente antes de su contacto con el microorganismo, a excepción del material no reutilizable que se suministra en condiciones de esterilidad. Dado que ninguno de los compuestos que forman parte de los medios de cultivo ni los materiales empleados son sensibles al calor, el ciclo de esterilización consiste en un ciclo húmedo que mantiene la temperatura en 121 °C durante 20 min. Estas condiciones se alcanzan y controlan en un autoclave. Además, la atmósfera estéril requerida en las operaciones que implican una manipulación del microorganismo, como la siembra e inoculación, se consigue trabajando en el interior de una cámara de flujo, previamente esterilizada de forma química con isopropanol.

2.3.2 CONSERVACIÓN DEL BIOCATALIZADOR

Las cepas de *Raoultella planticola* CECT 843 y *Raoultella terrigena* CECT 4519, proporcionadas por Biopolis, S. L. en placa Petri en medio de cultivo sólido LB-agar, son incubadas a 30 °C durante un periodo de 24 h en una estufa de incubación para conseguir el crecimiento del microorganismo. Posteriormente, a partir de la biomasa presente en la placa Petri, se inocula con un asa de siembra un matraz *Erlenmeyer* de 250 mL que contiene 50 mL del medio de cultivo 2 y se mantiene en la incubadora orbital de suelo a 30 °C y 200 rpm durante 8 h, que corresponde con el tiempo estimado que el microorganismo tarda en alcanzar la mitad de la fase exponencial del crecimiento. Las células se separan del caldo de cultivo por centrifugación a 9000 rpm durante 5 min. Tras eliminar el sobrenadante, el pellet formado por la biomasa se resuspende en el medio de conservación. El volumen empleado de éste debe ser el adecuado para dar lugar a un *stock* celular cuya concentración de biomasa es 10 g/L. Dicho *stock* se almacena en tubos *Eppendorf* de 1,5 mL de capacidad donde se introduce 1 mL de la solución para su conservación a -80 °C (recogida en la Tabla 2.4).

2.3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA PRODUCCIÓN CON CÉLULAS EN ESTADO DE CRECIMIENTO

La estandarización del protocolo experimental en el desarrollo de bioprocesos es determinante para minimizar la variabilidad en los resultados derivada del empleo de un microorganismo vivo como catalizador. Para alcanzar resultados reproducibles y repetitivos se ha implementado un procedimiento para los ensayos de producción de 2,3-BD con células en crecimiento constituido por dos etapas, según las directrices marcadas por la extensa experiencia del Grupo de Investigación *Físicoquímica de los Procesos Industriales y Medioambientales* de la Universidad Complutense de Madrid, donde se enmarca la presente investigación en el desarrollo de bioprocesos. La primera etapa para la obtención del biocatalizador, en condiciones adecuadas que aseguren el estado metabólico adecuado de las células para su empleo ulterior. Seguidamente se lleva a cabo la segunda etapa, que es la que constituye el propio ensayo de producción del compuesto de interés. Cabe destacar que los experimentos de producción se han llevado a cabo en dos escalas diferentes. En el primer estadio de la investigación los ensayos se realizaron en botellas agitadas y posteriormente se trabajó en biorreactor de 2 L. A continuación se describe el procedimiento seguido para ambas y adaptado para ambos microorganismos.

OBTENCIÓN DEL BIOCATALIZADOR

El protocolo experimental llevado para la obtención del biocatalizador determina la adaptación experimentada por las células del *stock* congelado al medio de cultivo líquido y nuevas condiciones de trabajo, siendo el objetivo alcanzar la mitad de la fase exponencial del crecimiento en el menor tiempo posible. La metodología desarrollada en el Grupo de Investigación *Físicoquímica de los Procesos Industriales y Medioambientales*, para trabajar en escala de laboratorio, se basa en la preparación del biocatalizador mediante dos etapas de crecimiento sucesivas en incubadora (preinóculo e inóculo) que aseguran que las células alcancen un estado metabólico idóneo y reproducible.

El primer crecimiento o etapa de **preinóculo** se realiza a partir de las células almacenadas en el *stock* congelado a -80 °C. Se parte de 0,5 mL de dicho *stock*, que es empleado para inocular 50 mL de medio de cultivo 2 (ver composición en Tabla 2.7), contenidos en un matraz *Erlenmeyer* de volumen 250 mL e incubados a 30 °C y 200 rpm. La duración de esta etapa está determinada por el tiempo que tarda cada microorganismo en alcanzar la mitad de la fase exponencial del crecimiento: 8 h para *R. planticola* y 7 h para *R. terrigena*.

A partir del caldo de cultivo obtenido en la etapa de preinóculo, se procede a la siembra de en matraz *Erlenmeyer* de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo 2 (ver composición en Tabla 2.7), para proceder al segundo crecimiento o etapa de **inóculo**. En esta segunda etapa se controla además la concentración inicial de biomasa, determinándose el volumen de caldo de cultivo requerido de que permita alcanzar una concentración inicial en el inóculo de 0,25 g/L de biomasa. Las condiciones de operación de la etapa de inóculo son las mismas que en la etapa anterior y la duración de ésta es de 4 h para ambas cepas. Tras este periodo de tiempo, el caldo de cultivo obtenido constituye el cultivo empleado como inóculo de los ensayos de producción de 2,3-BD en crecimiento.

ENSAYOS DE PRODUCCIÓN DE 2,3-BD EN INCUBADORA ORBITAL

Para los ensayos de producción de 2,3-BD con células en estado de crecimiento en botellas agitadas se emplearon botellas de volúmenes diferentes (50 mL y 100 mL), el volumen de medio de cultivo viene determinado por el estudio que se vaya a llevar a cabo. Para los ensayos preliminares de influencia de la disponibilidad de oxígeno se emplean botellas cerradas herméticamente de 50 y 100 mL de volumen total con un volumen de trabajo variable, detallado en la planificación experimental recogida en la Tabla 3.2, localizada en el Capítulo 3. A modo ilustrativo se adjunta la fotografía de alguna de las condiciones empleadas (18,5, 35, 51, 65,7, 83,7 y 100% de volumen de aire) en la Figura 2.2. Cada botella es esterilizada con el medio correspondiente y son calentadas previamente a 30 °C; posteriormente son inoculadas con el volumen de caldo de cultivo de la etapa de inóculo necesario para que la concentración inicial de biomasa sea 0,25 g/L y agitadas a 175 rpm en una incubadora de mesa.

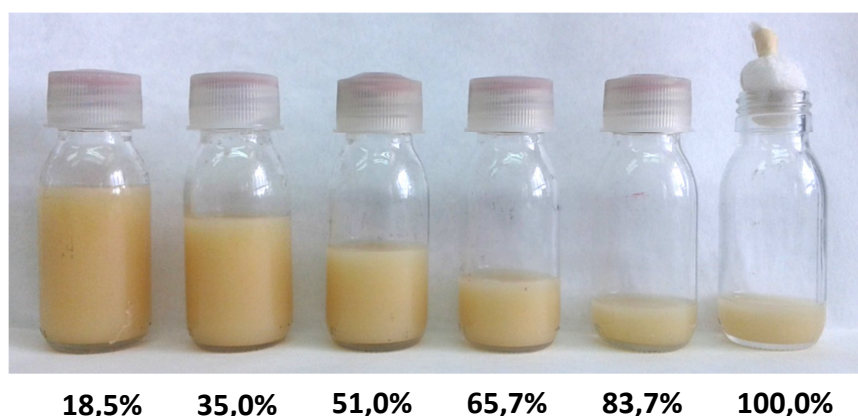


Figura 2.2 Fotografía de las botellas empleadas para el estudio preliminar de la influencia de la disponibilidad de oxígeno en la producción de 2,3-BD empleando células en crecimiento.

En los estudios en condiciones aerobias, se emplean botellas de 50 mL con 10 mL de medio de cultivo y tapón de algodón para permitir el intercambio de gases con el exterior. En este caso las condiciones de operación son las mismas: 175 rpm, 30 °C y volumen de inóculo necesario para que la concentración inicial de biomasa sea 0,25 g/L. Para el análisis de la evolución de las distintas variables medidas, es necesaria la preparación de una botella por cada punto experimental.

ENSAYOS DE PRODUCCIÓN DE 2,3-BD EN FERMENTADOR DE 2L

Para el desarrollo de los ensayos de producción de 2,3-BD en fermentador es necesario esterilizar previamente la cuba del biorreactor, que contiene 1,8 L de medio de cultivo 2, cuya composición se recogió en la Tabla 2.7 de este Capítulo. Posteriormente a esta operación, el equipo debe ser termostatzado a la temperatura de operación (30 °C). La velocidad de agitación se fija entre 100 y 625 rpm, según la planificación experimental desarrollada en cada Apartado, y el caudal de entrada de aire es 3 L/min, correspondiente a 1,5 vvm. Cuando se ha alcanzado la temperatura de operación, es necesario calibrar la sonda de oxígeno para las condiciones de velocidad de agitación y caudal de aireación empleadas. Para realizar la calibración, el equipo requiere dos puntos: el 0% de oxígeno disuelto, correspondiente a la señal que recibe cuando la sonda está desconectada, y el 100%, correspondiente a la señal que recibe del electrodo en las condiciones de operación de cada experimento.

El experimento comienza cuando el fermentador es inoculado. Para ello, se emplean 200 mL de caldo de cultivo, proveniente de la segunda etapa de crecimiento del biocatalizador, descrita en el Epígrafe anterior. De tal forma que el volumen total de trabajo son 2 L y la concentración inicial de biomasa es 0,25 g/L. Durante todo el crecimiento se registra *online* la evolución de pH, temperatura, velocidad de agitación, porcentaje de oxígeno disuelto en el medio líquido y porcentaje de oxígeno y dióxido de carbono del gas de salida mediante el software *MFCS/WIN* 3.0. A lo largo del experimento extraen muestras del caldo de cultivo a diferentes tiempos para evaluar la evolución de la biomasa, concentración de glicerina, 2,3-BD y del resto de metabolitos de la ruta, cuya determinación se lleva a cabo mediante las técnicas analíticas descritas en el Apartado 2.4.

2.3.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA PRODUCCIÓN CON CÉLULAS EN *RESTING CELLS*

De forma análoga al Apartado anterior, los ensayos de producción de 2,3-BD empleando células en estado de *resting cells* requieren dos etapas: la obtención del biocatalizador y la operación de producción de 2,3-BD, cuyo procedimiento experimental se detalla a continuación.

OBTENCIÓN DEL BIOCATALIZADOR

Para llevar a cabo los ensayos de producción de 2,3-BD con células en estado de *resting cells*, es necesario llevar a cabo una etapa de crecimiento adicional posterior a las etapas de preinóculo e inóculo para obtener el biotacalizador en las condiciones adecuadas para trabajar con las células en estado de *resting cells*. El desarrollo de las dos primeras etapas es análogo al descrito en el Apartado anterior. La tercera y última etapa de crecimiento se realiza en biorreactor de 2 L de volumen de trabajo en las mismas condiciones y siguiendo los mismos protocolos que en los experimentos de producción de 2,3-BD con células en crecimiento. La optimización de las condiciones de operación de esta etapa será discutida en el Apartado 5.1 del Capítulo 5. Fruto de este estudio se determinó que el crecimiento del biocatalizador para el desarrollo de la producción de 2,3-BD con células en estado de *resting cells* debe llevarse a cabo en las siguientes condiciones: velocidad de agitación 250 rpm; temperatura de operación 30 °C; concentración inicial de biomasa 0,25 g/L; tiempo de crecimiento 20 h. Posteriormente, el caldo de cultivo obtenido es centrifugado a 9.000 rpm durante 5 min en botes de 250 mL para la posterior recuperación del *pellet* de células mediante la resuspensión de las mismas en el tampón adecuado según la planificación desarrollada en los bloques experimentales del Capítulo 5.

ENSAYOS DE PRODUCCIÓN DE 2,3-BD EN INCUBADORA (MATRAZ AGITADO)

En los primeros estudios de producción de 2,3-BD empleando células en estado de *resting cells*, los ensayos se realizaron en matraz *Erlenmeyer* de 250 mL que contienen 40 mL de la disolución amortiguadora correspondiente, a la que se adiciona el volumen de solución celular necesario para alcanzar la concentración de biomasa requerida según la planificación experimental prevista en cada caso. Las condiciones de operación se mantienen en 30 °C y 200 rpm. Durante el experimento se toman las muestras necesarias para la medida del pH y el análisis de la glicerina, 2,3-BD y el resto de subproductos de la ruta metabólica. Cabe destacar que únicamente se puede extraer el 10% del volumen del caldo en el muestreo para que las condiciones de aireación y mezcla se consideren constantes. Por ello, para cada experimento

será preciso preparar el número de matraces *Erlenmeyer* necesarios en función del seguimiento deseado del proceso.

ENSAYOS DE PRODUCCIÓN DE 2,3-BD EN FERMENTADOR DE 1L

Los experimentos en biorreactor se llevan a cabo en un equipo de 1,5 L de volumen total, cuyo volumen de trabajo es 450 mL. Durante todo el crecimiento se registra *online* la evolución de pH, temperatura, velocidad de agitación y porcentaje de oxígeno disuelto en el medio líquido. Las condiciones de operación empleadas son las siguientes: temperatura de 30 °C, caudal de aire de entrada 0,68 L/min (correspondiente a 1,5 vvm) y velocidad de agitación entre 200 y 500 rpm. De la misma manera que en los experimentos de producción de 2,3-BD con células en crecimiento en biorreactor, se toman muestras periódicas para en análisis de los distintos compuestos involucrados.

2.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

Para el seguimiento de los experimentos de producción de 2,3-BD fue necesario el desarrollo y puesta a punto de métodos de análisis de la concentración de biomasa presente en el caldo de cultivo, así como la cuantificación de la concentración de los distintos metabolitos, mediante las técnicas analíticas descritas a continuación.

2.4.1 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR

El análisis de la concentración celular en el caldo de cultivo (como peso seco de biomasa por litro de caldo de cultivo) se realizó mediante la determinación directa con la medida de la absorbancia a 600 nm que proporciona el espectrofotómetro UV-Vis. Para ello, es necesario determinar previamente la ecuación de calibrado que relaciona ambas variables (absorbancia y peso seco).

Para obtener la curva de calibrado, se realiza un crecimiento de cada microorganismo al medio de cultivo 2 en incubadora orbital a 200 rpm y 30°C, hasta alcanzar una densidad óptica elevada. Una muestra de este caldo de cultivo se somete a centrifugación (14.000 rpm durante 10 min) y la biomasa separada se seca a 105 °C hasta alcanzar peso constante. Paralelamente, se realizan diluciones del caldo con el fin de medir la absorbancia de cada una de las muestras. De esta forma, se obtienen pares de valores concentración de biomasa-absorbancia, que es posible ajustar mediante regresión lineal a una expresión lineal de tipo Lambert-Beer. En la Tabla 2.9 se muestra la pendiente de la recta de calibrado para cada microorganismo. La relación entre la concentración de biomasa y la absorbancia mantiene la linealidad entre valores de 0,1 y 0,8

unidades de absorbancia. En el caso de que el valor de absorbancia de una muestra tomada durante el crecimiento en el medio de cultivo superase el extremo superior del intervalo de linealidad del calibrado, es preciso proceder a la dilución de la misma con agua destilada para conseguir que la absorbancia medida se encuentre en la región lineal del calibrado.

Tabla 2.9 Pendiente de la recta de calibrado para el análisis de la concentración de biomasa por espectofotometría a 600 nm para cada uno de los microorganismos empleados.

MICROORGANISMO	PENDIENTE
<i>R. planticola</i>	0,64 ± 0,02
<i>R. terrigena</i>	1,05 ± 0,02

2.4.2 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL CALDO DE CULTIVO

La determinación de la composición del caldo de cultivo en relación con la concentración de sustrato carbonado y la de los productos de fermentación (2,3-BD, acetoína, ácido láctico, ácido acético y etanol), se ha llevado a cabo mediante análisis de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). El equipo empleado se ha descrito en el Apartado 2.2.3.

Las condiciones del método de análisis se describen a continuación:

- Columna: Rezex ROA – Organic Acid H⁺ (8 %). Tamaño: 300 x 7,8 mm.
- Temperatura del horno: 60 °C.
- Fase móvil: disolución acuosa de ácido sulfúrico 5·10⁻³ M.
- Caudal de la fase móvil: 0,6 mL/min.
- Volumen de inyección: 15 µL.
- Tiempo de análisis: 30 min.
- Detectores: Diodo de Array (DAD) e Índice de Refracción (RID).
- Temperatura del detector RID: 55 °C.

El mantenimiento del equipo cromatográfico requiere evitar la entrada de sólidos en al mismo, ya que éstos pueden obstruir los capilares por los que circula la fase móvil así como la columna. Por ello, las muestras tomadas durante los experimentos de producción de 2,3-BD deben ser centrifugadas (o filtradas) previamente a su análisis para eliminar la biomasa presente en el caldo de cultivo. Las muestras, almacenadas en tubos *Eppendorf* de 1,5 mL, son centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 min. Una vez centrifugadas las muestras, se toman

0,7 mL del sobrenadante con una micropipeta automática y se traslada dicho volumen a un vial de HPLC. Las muestras serán almacenadas a -5 °C hasta el momento de su análisis, pudiendo ser conservadas durante varias semanas antes del análisis, sin que esto provoque la alteración de la composición del caldo de cultivo.

La cuantificación de la concentración de cada compuesto es posible mediante la separación de los metabolitos presentes en la muestra en el interior de la columna. El mecanismo de separación que permite la columna empleada se basa en dos criterios:

- Separación en función de las cargas netas de los compuestos. Las cargas negativas de los grupos funcionales se unen covalentemente a la matriz cargada positivamente, mientras que los compuestos neutros o con cargas positivas no quedan retenidos. Por lo tanto, los tiempos de retención de estos últimos son mucho menores.
- Separación en función del tamaño de partícula. Los compuestos cuyo tamaño molecular sea menor que el tamaño de poro quedan retenidos. Las moléculas de tamaño grande se excluyen totalmente y son eluidas en primer lugar, mientras que las de pequeño tamaño tienen acceso a todo el volumen poroso y son las últimas que se eluyen.

Cada molécula presenta un tiempo de retención (t_R) característico que permite discernirla de las demás y su concentración puede ser determinada mediante una relación lineal con el área del pico cromatográfico que se registra en el detector empleado. Según el método analítico descrito anteriormente, todos los compuestos presentes en el caldo de cultivo (glicerol, 2,3-BD, acetoína, ácido láctico, ácido acético y etanol) se detectan en el RID. En la Tabla 2.10 se adjuntan los datos del calibrado del método de análisis para los metabolitos medidos.

El método de análisis anteriormente descrito no permite la separación de los picos cromatográficos correspondientes al 2,3-BD y su precursor en la ruta metabólica, la acetoína, debido a la similitud de su estructura química. En el cromatograma correspondiente al detector RID, se observa un pico entre 22,8 y 23,0 min, cuyo área corresponde a la suma de las áreas de los picos de las concentraciones de ambos. Para cuantificar la concentración de *meso*-2,3-BD y acetoína presente en las muestras de caldo de cultivo, se emplea el detector DAD, que únicamente detecta moléculas con dobles enlaces, como la acetoína. A partir del cromatograma del DAD medido a 270 nm, longitud de onda en la cual el espectro de la acetoína presenta un máximo y por tanto, el análisis de su concentración es más preciso, se puede cuantificar la

cantidad de acetoína presente en el caldo de cultivo. A partir de esta información, es posible saber cuál sería el área correspondiente al pico de acetoína en el cromatograma del RID y, por diferencia de ésta con el área del pico correspondiente al *meso*-2,3-BD y la acetoína, se determina la concentración del diol. En la Tabla 2.10 se muestran las constantes de las rectas de calibrado de ambos detectores para la acetoína así como la del *meso*-2,3-BD en el RID.

Cabe destacar que la columna cromatográfica empleada no permite la separación de los isómeros (2*R*, 3*R*)-(-)-2,3-butanodiol y (2*S*, 3*S*)-(+)-2,3-butanodiol, por tanto la señal observada a 24,1 min corresponde con la suma de ambos isómeros. Debido a que el objetivo último de esta Tesis Doctoral es maximizar la producción de 2,3-BD de cualquiera de sus isómeros, los resultados experimentales se expresan como concentración de 2,3-BD total, que corresponde a la suma de los tres isómeros.

Tabla 2.10 Detalles del método analítico para la composición de los metabolitos presentes en el caldo de cultivo: tiempo de retención característico de cada compuesto, detector empleado y factor de correspondencia entre el área y la concentración para cada uno.

COMPUESTO	t_R (min)	DETECTOR	PENDIENTE $\cdot 10^6$
Ácido láctico	16,6	RID	$7,97 \pm 0,02$
Glicerol	17,2	RID	$4,92 \pm 0,02$
Ácido acético	19,2	RID	$9,14 \pm 0,04$
Acetoína	22,8	DAD	$2,05 \pm 0,08$
Acetoína	22,8	RID	$5,59 \pm 0,25$
<i>meso</i> -2,3-butanodiol	23,0	RID	$4,78 \pm 0,03$
(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-(-)-2,3-butanodiol	24,1	RID	$5,20 \pm 0,04$
(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-(+)-2,3-butanodiol	24,1	RID	$5,20 \pm 0,04$
Etanol	26,9	RID	$9,71 \pm 0,03$

2.5 MÉTODOS MATEMÁTICOS

En este Apartado se describen los métodos matemáticos empleados en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, referentes tanto al diseño experimental utilizado para la optimización de algunas condiciones de operación, como al método de estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de materia y a los métodos matemáticos de ajuste estadístico para la modelización del proceso.

2.5.1 DISEÑO DE EXPERIMENTOS TAGUCHI

El diseño de experimentos es una poderosa herramienta estadística que permite analizar el efecto de múltiples variables en un proceso de forma simultánea. El conocido diseño de experimentos Taguchi tiene en cuenta las consideraciones que el Dr. Genichi Taguchi realizó sobre el diseño de experimentos a finales de los años 40, aunque no fue hasta mediados de los años 80 cuando se estandarizó en EEUU dicho método. Desde la perspectiva de Taguchi es necesario diseñar productos robustos que toleren variaciones en el proceso de producción y durante el servicio de mantenimiento. Para ello, el Método Taguchi combina métodos estadísticos y de ingeniería para optimizar los procesos de diseño y fabricación de modo que aumente la calidad y se reduzca el coste del producto.

La diferencia fundamental entre el diseño de experimentos Taguchi y los diseños de experimentos clásicos radica en la forma en que cada método maneja las interacciones entre los factores de entrada. Mientras que en el diseño experimental clásico se prueba con todas las combinaciones de niveles de entrada, o una fracción simétrica de las mismas, con el método de Taguchi se trabaja con una porción pequeña de las posibles combinaciones de factores de entrada, pero de una manera que permite calcular los efectos de todos los factores de entrada en el resultado de interés, minimizando así la carga experimental de la optimización del proceso.

Según la metodología Taguchi, las etapas en el diseño de un producto o un proceso se detallan a continuación (Wu y Wu, 1997):

- **Diseño del sistema.** En esta primera etapa se aplica el conocimiento científico y de ingeniería de un área determinada para averiguar cuáles son los factores y niveles que influyen en el desarrollo del producto o proceso.
- **Diseño de los parámetros.** En esta segunda etapa se determinan los niveles o valores de los factores controlables que optimizan el proceso para conseguir alta calidad a bajo coste, minimizando el efecto de los factores incontrolables en las características del producto. Generalmente se conoce a esta fase como **Método Taguchi** y es la más relacionada con el diseño experimental. Esta etapa se caracteriza por la planificación experimental mediante el uso de matrices ortogonales y el análisis de los resultados mediante la evaluación de la Relación Señal Ruido (RSR).

- **Diseño de tolerancias.** Esta etapa final apunta a reducir la varianza en las características del producto terminado cuando la reducción lograda en el diseño de los parámetros no es suficiente.

La primera etapa del **diseño de los parámetros** es la identificación de los factores o variables cuya influencia en el proceso o producto de interés se desea estudiar y optimizar, así como los niveles de cada uno de ellos. El número de factores y niveles determina la planificación experimental a desarrollar, según las matrices ortogonales estandarizadas. De esta forma, la matriz ortogonal determina el número de ensayos a realizar y la combinación de factores y niveles en cada uno de ellos. Las matrices ortogonales estandarizadas se caracterizan porque cada par de columnas es ortogonal entre sí, asegurando que los efectos de los factores pueden separarse a partir de los resultados experimentales. Se consigue de esta forma minimizar la etapa de experimentación en el diseño del proceso o producto.

Después de la realización de los ensayos y la recolección de los datos experimentales se debe realizar el análisis de los mismos. La metodología Taguchi define la RSR como el ratio entre la señal intencionada (la parte útil) y el ruido (la parte nociva para la señal). Dicho de otra manera, este parámetro representa la relación entre la sensibilidad y la variabilidad. Para Taguchi, el uso de RSR elimina la necesidad de examinar las interacciones entre los factores controlables y los factores de ruido, si bien el examen de estas interacciones puede ocasionalmente mejorar la comprensión de los procesos estudiados.

El cálculo de RSR depende del tipo de característica de calidad que se considere. En la presente Tesis Doctoral se ha aplicado el Método Taguchi para la optimización de algunas de las condiciones de operación en el proceso de producción de 2,3-BD, estudio abarcado en el Capítulo 3. Por tanto, el objeto del método Taguchi aplicado en esta investigación es la maximización de la producción de 2,3-BD. Por tanto, el tipo de respuesta de salida que se busca es el tipo *mayor es mejor*, en cuyo caso el cálculo de RSR para el Factor F al nivel N se calcula como se muestra en la ecuación [2.1].

$$RSR_{Factor\ F/Nivel\ N} = -10 \cdot \log_{10} \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right] \quad [2.1]$$

Donde y_i es la respuesta de la variable en estudio y n el número de repeticiones realizadas para cada experimento.

A través de la representación de las denominadas gráficas lineales es posible interpretar los resultados experimentales, en términos de influencia relativa de cada factor estudiado, y

determinar las condiciones óptimas que maximicen la función objetivo definida. La gráfica lineal representa el valor medio de la RSR de aquellos experimentos realizados al mismo nivel N del factor F frente a los distintos niveles de N de dicho factor. De esta forma, se representa una gráfica lineal para cada factor estudiado. La influencia relativa de cada factor viene dada por la amplitud de los valores medios de RSR: cuanto mayor es la diferencia entre estos valores, mayor será la influencia del factor en cuestión. Asimismo, el nivel de cada factor que maximiza la respuesta es aquel que conduce a un mayor valor de la media de la RSR para ese nivel.

Por último, es necesaria la verificación de las conclusiones extraídas en el método Taguchi, para lo cual se requiere la realización de un experimento de confirmación en aquellas condiciones determinadas como óptimas. El resultado obtenido debe proporcionar una mejora en términos de las variables estudiadas respecto al resto de experimentos realizador en la planificación experimental de la matriz ortogonal.

2.5.2 MÉTODO DE ESTIMACIÓN DE $k_L \cdot a$

Debido a la complejidad que entraña el fenómeno de transferencia de oxígeno en un biorreactor tipo tanque agitado, multitud de autores emplean modelos empíricos simplificados para la descripción del fenómeno de la transferencia en su interior (Ozbek y Gayik, 2001; Galaction y col., 2004; Kapic y Heindel, 2006; Araujo y col., 2009). Sin embargo, en este trabajo se ha realizado una estimación teórica del coeficiente $k_L a$ empleando un método predictivo, fruto del conocimiento y trabajo previo del *Grupo de Investigación Físico-Química de los Procesos Industriales y Medioambientales* (García-Ochoa y Gómez, 2004), que ha proporcionado muy buenos resultados en otras líneas de investigación (Escobar, 2013; Martínez, 2013; García-Ochoa y col., 2013). La predicción del coeficiente volumétrico de transferencia de materia, $k_L a$, integra la predicción del coeficiente de transferencia de materia, k_L , y la determinación del área interfacial específica, a .

La predicción del coeficiente de transferencia de materia, k_L , se basa en la teoría de penetración de Higbie (Kawase y col., 1987; Billet y Schultes, 1993; Kawase y Hashiguchi, 1996; Tobajas y col., 1999), que está ampliamente aceptada para la descripción de la transferencia gas-líquido y que supone la difusión no estacionaria de los elementos en dicha interfase (Kawase y col., 1987; Tobajas y col., 1999; Billet y Schultes, 1993; Kawase y Hashiguchi, 1996; Shimizu y col., 2000 y 2001). La expresión resultante para la predicción de k_L , se muestra en la ecuación [2.2], que depende de la intensidad de la turbulencia expresada como una función de la energía disipada.

$$k_L = 2 \cdot \sqrt{\frac{D_L}{\pi \cdot t_e}} \quad [2.2]$$

Donde D_L es la difusividad del oxígeno en el líquido en las condiciones del experimento y t_e es el tiempo de exposición.

El tiempo de exposición, t_e , determina el tiempo en el que una burbuja se desplaza una longitud igual a su diámetro y es calculado en base a la teoría de turbulencia isotrópica de Kolmogoroff. Si se considera que el comportamiento reológico del fluido se describe mediante el modelo de Ostwald – de Waele, la expresión resultante para el tiempo de exposición se muestra en la Ecuación [2.3].

$$t_e = \left(\frac{K}{\varepsilon \cdot \rho} \right)^{\frac{1}{(1+n)}} \quad [2.3]$$

Donde K es el índice de consistencia en el modelo de la ley de potencia, ε es la velocidad de disipación de energía, ρ es la densidad y n es el índice de flujo en el modelo de la ley de potencia.

Para el cálculo de la velocidad de disipación de energía cercana a la interfase, ε , se asume que se corresponde con la energía consumida en el contacto entre los elementos del líquido y las burbujas de gas, que, en un tanque agitado puede determinarse mediante la expresión [2.4].

$$\varepsilon \approx \varepsilon_{media} = \frac{P}{\rho \cdot \left(\frac{\pi}{4} \right) \cdot T^2 \cdot h} \quad [2.4]$$

Donde P es la potencia suministrada, T es el diámetro del agitador y h el peso del mismo.

Para el cálculo de la potencia suministrada, P , en el caso de sistemas aireados, se puede utilizar la ecuación [2.5],

$$P = \alpha \cdot \left(\frac{P_0^2 \cdot N \cdot T^3}{Q^{0.56}} \right)^\beta \quad [2.5]$$

Donde la potencia introducida por el agitador en el sistema no aireado, P_0 , determinada a partir del número adimensional de potencia, y las constantes α y β dependen de la configuración del sistema de agitación. Los valores de estas últimas para un sistema con dos turbinas Rusthon son: $\alpha=1,224$ y $\beta=0,432$ (Abrardi y col., 1988).

La potencia suministrada, P_0 , se puede evaluar teniendo en cuenta que el número de potencia, N_p , que puede considerarse constante en régimen turbulento ($Re > 10000$) y, por tanto, sólo depende del tipo de agitador y de la geometría según la expresión [2.6].

$$N_p = \frac{P_0}{\rho \cdot N^3 \cdot T^5} \quad [2.6]$$

Haciendo uso de las expresiones anteriores, es posible determinar el coeficiente de transferencia, k_L , una vez conocidos todos los parámetros del sistema.

El área interfacial específica, a , depende de las propiedades hidrodinámicas del reactor, determinadas por la geometría del mismo y las propiedades físicas del sistema. A saber, el diámetro de burbuja, d_b , y la fracción volumétrica del gas en el líquido (*hold-up*), Φ . La ecuación [2.7] permite el cálculo del área interfacial cuando las burbujas se suponen esféricas.

$$a = 6d_b / \Phi \quad [2.7]$$

El *hold-up* del gas puede estimarse a partir de la teoría de la turbulencia isotrópica (Kudrewizki y Rabe, 1986), tal y como muestra la expresión [2.8].

$$\frac{\phi}{1-\phi} = 0,819 \cdot \left(\frac{V_S^{2/3} \cdot N^{2/5} \cdot T^{4/15}}{g^{1/3}} \right) \cdot \left(\frac{\rho_L}{\sigma} \right)^{1/5} \cdot \left(\frac{\rho_L}{\rho_L - \rho_G} \right) \cdot \left(\frac{\rho_L}{\rho_G} \right)^{-1/15} \cdot \left(\frac{\mu_L}{\mu_G} \right)^{-1/4} \quad [2.8]$$

El diámetro de burbuja, d_b , puede determinarse a través de un baslance entre la resistencia de la interfase y la presión dinámica ejercida por el flujo turbulento sobre la burbuja produciendo su rotura. A través de la suposición de que el número adimensional de Weber se mantiene constante, se llega a la expresión [2.9] para el cálculo de d_b (Bhavaraju y col., 1978).

$$d_b = 0,7 \cdot \frac{\sigma^{0,6}}{\left(\frac{P}{V} \right)^{0,4} \cdot \rho_L^{0,2}} \cdot \left(\frac{\mu_L}{\mu_G} \right)^{0,1} \quad [2.9]$$

De tal forma que el área interfacial específica puede ser calculada a partir de las ecuaciones anteriores. Este valor, junto con el del coeficiente de transferencia de materia, permite la predicción teórica del coeficiente de transferencia de materia.

En las Tablas 2.11 y 2.12 se muestran los valores de las propiedades físicas del sistema y las condiciones de operación empleadas para la predicción teórica del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno para cada uno de los biorreactores empleados.

Tabla 2.11 Valores de las propiedades físicas y de las condiciones de operación usadas en la estimación teórica del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en el biorreactor comercial de 2,5 L con 2 L de volumen de trabajo.

Propiedades físicas	Difusividad en el líquido	D_L (m ² /s)	$2,0 \cdot 10^{-9}$
	Viscosidad del líquido	μ_L [kg/(m·s)]	$1,5 \cdot 2 \cdot 10^{-3}$
	Viscosidad del gas	μ_G [kg/(m·s)]	$2 \cdot 10^{-5}$
	Tensión superficial	σ (N/m)	0,045
	Densidad del líquido	ρ_L (kg/m ³)	1100
	Densidad del gas	ρ_G (kg/m ³)	1,18
Parámetros geométricos	Diámetro del agitador	T (m)	0,054
	Diámetro del tanque	D (m)	0,13
Condiciones de operación	Velocidad superficial del gas	V_s (m/s)	$1,25-12,5 \cdot 10^{-3}$
	Velocidad de agitación	N (rpm)	100-625
	Número de potencia	N_p (-)	9

Tabla 2.12 Valores de las propiedades físicas y de las condiciones de operación usadas en la estimación teórica del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en el biorreactor comercial de 1,5L de volumen total y 450 mL de volumen de trabajo.

Propiedades físicas	Difusividad en el líquido	D_L (m ² /s)	$2,0 \cdot 10^{-9}$
	Viscosidad del líquido	μ_L [kg/(m·s)]	$1,5 \cdot 2 \cdot 10^{-3}$
	Viscosidad del gas	μ_G [kg/(m·s)]	$2 \cdot 10^{-5}$
	Tensión superficial	σ (N/m)	0,045
	Densidad del líquido	ρ_L (kg/m ³)	1100
	Densidad del gas	ρ_G (kg/m ³)	1,18
Parámetros geométricos	Diámetro del agitador	T (m)	0,054
	Diámetro del tanque	D (m)	0,11
Condiciones de operación	Velocidad superficial del gas	V_s (m/s)	$5,26 \cdot 10^{-4}$
	Velocidad de agitación	N (rpm)	200-500
	Número de potencia	N_p (-)	9

2.5.3 MODELIZACIÓN CINÉTICA DEL PROCESO

El objetivo de la modelización cinética de un proceso es conseguir la descripción matemática de la evolución de las especies implicadas en el mismo en las condiciones estudiadas y la predicción de las citadas evoluciones cuando se modifique la forma de operación o el tipo de reactor empleado.

Para el planteamiento del modelo cinético es necesario seguir una serie de etapas, que se detallan a continuación:

- **Formulación del modelo cinético.**

La formulación del modelo cinético consiste en el planteamiento de una red de reacciones que describa las transformaciones químicas que tienen lugar así como las ecuaciones cinéticas que determinen la velocidad a la que transcurre cada una de las reacciones involucradas en la red. Las ecuaciones cinéticas planteadas son ecuaciones diferenciales que pueden nacer de hipótesis fenomenológicas o bien descripciones empíricas. A partir del esquema de reacción y de las velocidades de reacción se plantea la velocidad de producción de cada compuesto, teniendo en cuenta las reacciones en que cada uno está implicado y la estequiometría de las mismas (García-Ochoa y col., 1993).

- **Estimación de los parámetros cinéticos.**

La estimación de los parámetros cinéticos del modelo se lleva a cabo mediante el ajuste de las velocidades de producción de los diferentes componentes del sistema a los datos experimentales. En este trabajo, los datos experimentales obtenidos son de tipo integral (concentración vs. tiempo). El cálculo de los parámetros cinéticos a través del método diferencial con datos integrales introduce un gran error matemático en los parámetros obtenidos, por lo que es preferible aplicar el método integral, para lo cual es necesario llevar a cabo la integración de las ecuaciones diferenciales (García-Ochoa y col., 1992), que es lo que se ha realizado en la presente Memoria, siendo necesario el acople de un algoritmo de integración numérica y un algoritmo de ajuste estadístico. Para ello, en el presente trabajo se ha empleado el software *Aspen Custom Modeler*[®], que incluye diversos algoritmos de cálculo.

Para la integración numérica de las ecuaciones se ha seleccionado el método implícito de Euler con paso variable, lo que permite tener un control del error, un menor gasto de recursos de cálculo y una mayor precisión en los resultados.

El sistema es no lineal, por lo que el ajuste del modelo se ha llevado a cabo empleando un algoritmo no lineal denominado NL2SOL (*non-linear least-squares solver*), siendo el criterio para el cálculo del valor óptimo de los parámetros la minimización de la suma del cuadrado de los residuos (SRC).

- **Validación del modelo.**

Una vez que los valores de los parámetros cumplan los criterios físicos establecidos, la validación del modelo se realiza atendiendo a los parámetros estadísticos. En este trabajo se han considerado los siguientes:

- **Suma de residuos al cuadrado (SRC).** Hace referencia a la diferencia entre el valor experimental y el predicho por el modelo para cada respuesta, tal y como muestra la ecuación [2.10]. Cuanto menor sea el valor de este parámetro, mejor será el ajuste del modelo a los datos experimentales, por tanto lo deseable es minimizar su valor.

$$SRC = \sum_{i=1}^n (y_{experimental} - y_{teorico})^2 \rightarrow \text{Mínimo} \quad [2.10]$$

- **Error Residual Medio al Cuadrado (ERMC).** Se trata de una medida de la diferencia entre los valores predichos de la variable y los observados. Tiene en cuenta la cantidad de datos (N) y el número de parámetros del modelo (P), tal como se aprecia en la ecuación [2.11].

$$ERMC = \sqrt{\frac{SRC}{N-P}} \quad [2.11]$$

- **F-Fisher al 95% de confianza (F-Fisher).** En la ecuación [2.12] se muestra la fórmula para su cálculo. Cuanto mayor sea el valor de este parámetro, mejor será el ajuste y más representativo el modelo (el porcentaje de confianza está tabulado y depende del número de datos empleados en el ajuste y del número de parámetros a calcular en el mismo).

$$F - Fisher = \frac{\sum \frac{(y_{calc})^2}{P}}{\sum \frac{SRC}{N-P}} \quad [2.12]$$

Donde N es el número de total de datos experimentales, P es el número de parámetros del modelo, SQR la suma de residuos al cuadrado, y_{exp} es el valor experimental de la variable.

- **Porcentaje de variación explicada (VE).** Este parámetro, definido en la ecuación [2.13], determina la bondad del modelo para predecir las tendencias. Cuanto más se acerque dicho valor a la unidad, mayor poder explicativo tendrá el modelo de regresión.

$$VE(\%) = 100 \cdot \left[1 - \frac{\sum_{i=1}^N (y_{exp} - y_{calc})^2}{\sum_{i=1}^N (y_{exp} - \bar{y}_{exp})^2} \right] \quad [2.13]$$

2.6 BIBLIOGRAFÍA

Abrardi, V.; Rover, G.; Sicardi, S.; Baldi, G.; y Conti, R. (1988). Sparged vessels agitated by multiple turbines. *Proceedings of the European Conference Mixtures*, 6: 329-336.

Araujo, D.; Rivas, B.; Figueiredo, A. L.; Pessoa-Junior, A. y Converti, A. (2009). Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractive fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 47: 122-126.

Billet, R. y Schultes, M., 1993. Predicting mass transfer in packed columns. *Chemical Engineering Technology*, 16: 1-9.

Bhavaraju, S.M.; Russell, T.W.F y Blanch, H.W. (1978). The design of gas sparged devices for viscous liquid systems. *American Institute of Chemical Engineering Journal*, 24: 454-466.

Calzada, J. (2010). Desulfuración de dibenzotiofeno con *Pseudomonas putida* CECT 5279: Formas de operación. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Dennis, J. E.; Gay, D. M. y Welsch, R. E. (1981). Algorithm 573: NL2SOL-An Adaptive Nonlinear Least-Squares Algorithm, ACM T. *Mathlab Software*, 7, 369-383.

Drancourt, M.; Bollet, C.; Carta, A. y Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 925-932.

Escobar, S. (2013). Estudio del transporte y consumo de oxígeno en cultivos bacterianos: estrés hidrodinámico. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Galaction, A. I.; Cascaval, D.; Oniscu, C. y Turnea, M. (2004). Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeast and fungus broths. *Biochemical Engineering Journal*, 20: 85-94.

Galdeano, C. (2007). Producción de 1,3-propanodiol usando *Klebsiella oxytoca* NRRL B-199: Optimización del medio de cultivo mediante el método Taguchi. Diploma de Estudios Avanzados. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Garcia-Ochoa, F.; Romero, A. y Santos, V. E. (1992). Comparison of methods for determining the kinetic parameters in complex reactions. *International Chemical Engineering*, 32(2): 538-551.

Garcia-Ochoa, F.; Romero, A.; Santos, V. E. y Rodriguez, C. O. (1993). Studies of the use of the differential method in the determination of kinetic models for complex reactions. *International Chemical Engineering*, 33: 634-648.

Garcia-Ochoa, F. y Gomez, E. (2004). Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chemical Engineering Science*, 59: 2489-2501.

Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E.; Alcon, A. y Santos, V.E. (2013). The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 36: 911-925.

Gautschi, W. (1997). Numerical Analysis: An Introduction. Boston: Birkhäuser.

Kapic, A. Y Heindel, J. (2006). Correlating gas-liquid mass transfer in a stirred-tank bioreactor. *Chemical Engineering Research and Design*, 84(A3): 239-245.

Kawase, Y.; Halard, B.; Moo-Young, M. (1987). Theoretical prediction of volumetric mass transfer coefficients in bubble columns for Newtonian and non-Newtonian fluids. *Chemical Engineering Science*, 42: 1609-1617.

Kawase, Y. y Hashiguchi, N. (1996). Gas-liquid mass transfer in external-loop airlift columns with Newtonian and non-Newtonian fluids. *Chemical Engineering Journal*, 62: 35-42.

Kudrewizki, F. y Rabe, P. (1986). Model of the dissipation of mechanical energy in gassed stirred tanks. *Chemical Engineering Science*, 41: 2247-2252.

Martin, A.B.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2004). Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for dibenzothiophene biodesulfurization for different media compositions. *Energy Fuels*, 18: 851-857.

Martin, A.B.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2005). Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida*CECT5279 for DBT biodesulfurization: influence of the operational conditions. *Energy Fuels*, 19: 775-782.

Martínez, I. (2013). Biodesulfuración de dibenzotiofeno con *Pseudomonas putida* KTH2: una aproximación al cambio de escala del proceso. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Olmo, C.H. (2004). Biodesulfuración de dibenzotiofeno con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Ozbek, B. y Gayik, S. (2001). The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochemistry* 36: 729-741. *Cytotechnology*, 22: 225-237.

Saikh, M. M. y Morgan, M. (2011). Sepsis caused by *Raoultella terrigena*. *Journal of the Royal Society of Medicine Short Reports*, 2(49): 1-3.

Shimizu, K.; Takada, S.; Minekawa, K. y Kawase, Y. (2000). Phenomenological model for bubble column reactors: prediction of gas hold-ups and volumetric mass transfer coefficients. *Chemical Engineering Journal*, 78: 21-8.

Shimizu, K.; Takada, S.; Takahashi, T. y Kawase, Y., (2001). Phenomenological simulation model for gas hold-ups and volumetric mass transfer coefficients in external-loop airlift reactors. *Chemical Engineering Journal*, 84: 599-603.

Tobajas, M.; Garcia-Calvo, E.; Siegel, M.H. y Apitz, S.E. (1999). Hydrodynamics and mass transfer prediction in a three-phase airlift reactor for marine sediment biotreatment. *Chemical Engineering Science*, 54: 5347-5354.

Wu, Y, y Wu, A. (1997). Diseño robusto utilizando los métodos Taguchi. Ed. Diaz de Santos.

CAPÍTULO 3

SELECCIÓN DEL BIOCATALIZADOR DEL PROCESO

El interés por la producción de 2,3-BD a partir de la fermentación de distintos materiales renovables o residuos orgánicos comenzó a mitad del siglo XX, llegando a obtenerse resultados satisfactorios ya en los años 40 y 50, empleando como sustrato hidrolizados de madera (Perlman, 1944), trigo (Katznelson, 1944; Ledingham y col., 1945), maíz (Ward y col., 1945) y melazas (McCall y Georgi, 1954). Sin embargo, la producción biológica de 2,3-BD como salida para revalorizar el glicerol procedente del proceso de producción de biodiésel destaca por su novedad, pues ha sido objeto de investigación de la comunidad científica desde hace menos de una década. En el contexto del desarrollo de cualquier proceso biotecnológico está implícito, en la primera etapa del mismo, la selección del microorganismo que va a ser empleado como biocatalizador. La novedad del proceso de interés acentúa la necesidad de búsqueda de un biocatalizador efectivo y seguro para el proceso. A partir de la información recopilada en la revisión bibliográfica, en la Tabla 3.1 se citan los microorganismos empleados en diferentes trabajos como biocatalizador del proceso. Cabe destacar que la mayoría de estos trabajos se enfocan en la descripción de nuevas cepas productoras de 2,3-BD, debido a que la mayoría de estas investigaciones se encuentran en los primeros estadios del desarrollo del bioproceso. Petrov y Petrova han abordado con mayor profundidad la comprensión del sistema estudiando la influencia de las condiciones de operación (Petrov y Petrova, 2009; Petrov y Petrova, 2010). El grupo de investigación liderado por Yang se ha focalizado en el papel de la regeneración del poder reductor (NADH_2) en la ruta metabólica para la obtención de 2,3-BD, como recientemente han publicado (Yang y col., 2015b).

Tabla 3.1 Microorganismos empleados en literatura como biocatalizador del proceso de producción de 2,3-BD a partir de glicerina como única fuente de carbono y su categoría en la clasificación de riesgo biológico que entraña cada uno de ellos.

MICROORGANISMO	GRUPO DE RIESGO	AUTORES
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	Yang y col., 2013 Yang y col., 2015a Yang y col., 2015b
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	Metsoviti y col., 2012
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	Huang y col., 2013 Petrov y Petrova, 2009 Petrov y Petrova, 2010
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	Huang y col., 2013 Yen y col., 2014 Cho y col., 2015
<i>Serratia marcescens</i>	1	Huang y col., 2013

Por otro lado, también en la Tabla 3.1 se proporciona información sobre el Grupo de Riesgo (GR) biológico al que pertenecen cada uno de los microorganismos citados. Para su comprensión, es necesario acudir a la clasificación realizada por el Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, donde se definen las características de los agentes biológicos pertenecientes a cada uno de los GR, según lo expuesto en el Real Decreto 665/1997. Los agentes biológicos clasificados dentro del GR-1 son aquellos que, habitualmente, no están asociados con enfermedades en el hombre. El GR-2 lo constituyen agentes que pueden ser patógenos para el hombre y pueden suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis o tratamiento eficaz.

Para los procesos biotecnológicos industriales que involucren agentes biológicos de GR-1, la legislación no contempla la implantación de medidas preventivas y de contención especiales, ya que se consideran actividades con riesgo nulo o insignificante. Por ello, la mejor opción para la implantación de un proceso biotecnológico seguro a nivel industrial es emplear como biocatalizador un microorganismo clasificado dentro de la categoría GR-1.

El trabajo de selección de un biocatalizador para el proceso de producción de 2,3-BD a partir de glicerina se enmarcó dentro del Proyecto Europeo ERA-IB *Production and Upgrading of 2,3-Butanediol from Biomass*, en el que participaba como miembro del equipo la empresa española de biotecnología Biopolis, S.L., especializada en el desarrollo y producción de microorganismos y metabolitos que puedan contribuir a lograr productos y procesos de interés

biotecnológico. El papel que jugó este miembro del consorcio en la investigación se centró en el *screening* para el aislamiento e identificación de diferentes microorganismos de GR-1 productores de 2,3-BD a partir de diferentes sustratos así como la caracterización de las rutas enzimáticas implicadas en la biotransformación de interés.

Debido al reducido número de especies descritas hasta el momento como biocatalizador en los trabajos previos encontrados en bibliografía y el potencial carácter patógeno de la mayoría de ellas, el *screening* realizado por Biopolis entrañó el estudio de un inmenso número de cepas potencialmente útiles para el proceso, provenientes de la selección de microorganismos catalogados en diferentes colecciones de cultivos (45 cepas) así como colonias aisladas de muestras de fango biológico de una depuradora de agua de una planta productora de biodiésel (850 microorganismos). El *screening* se realizó en dos fases: una primera evaluación de la capacidad potencial de las cepas aisladas para producir 2,3-BD y un estudio posterior más refinado para comparar la capacidad productora de aquellas que proporcionaron un resultado positivo en la primera de las fases. Los detalles del mismo se encuentran en los documentos publicados al respecto (Rojas y col., 2014; Ripoll y col., 2016), si bien las cepas que ofrecieron los resultados más prometedores y que cumplen con los requisitos de seguridad biológica anteriormente comentados, son las que serán estudiadas en este Capítulo como potenciales biocatalizadores del proceso. A saber, *Raoultella planticola* CECT 843 y *Raoultella terrigena* CECT 4519.

La información disponible en la literatura sobre ambas cepas es bastante escasa, centrada únicamente en torno a su aislamiento, identificación y descripción filogenética (Bagley y col., 1981; Izard y col., 1981; Blomquist y col., 1993; Drancourt y col., 2001). Por tanto, el trabajo inicial de esta investigación se encaminó al establecimiento de protocolos experimentales para la conservación, crecimiento y obtención del biocatalizador que permitan la obtención de resultados repetitivos y reproducibles.

El objetivo de este Capítulo es evaluar la capacidad productora de las cepas *R. planticola* y *R. terrigena* cuando se emplea tanto glicerina pura como glicerol crudo como únicas fuentes de carbono. Para ello, se realizó además un estudio sobre la influencia en la producción de 2,3-BD de algunas condiciones de operación. De esta manera, los resultados obtenidos servirán para establecer una comparación entre ambas cepas enfocada a la elección del mejor biocatalizador para el proceso de producción de 2,3-BD, que será empleado en las etapas posteriores del desarrollo del proceso biotecnológico de interés.

3.1 ESTUDIOS PRELIMINARES

En el presente Apartado se detallan los estudios realizados encaminados al desarrollo del protocolo estándar de trabajo para la obtención de un biocatalizador eficiente para el proceso. En este sentido, no sólo es necesario que la biomasa obtenida haya desarrollado la maquinaria metabólica adecuada para la biotransformación de interés durante las etapas de crecimiento previas, sino también conseguir minimizar el error experimental asociado al trabajo con microorganismos, para la obtención de resultados experimentales reproducibles.

3.1.1 ESTUDIO PRELIMINAR DE LA INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE OXÍGENO EN LA RUTA METABÓLICA DE *RAOULTELLA* SPP.

El 2,3-BD es producto del metabolismo anaeróbico, sin embargo, según se desprende de la información bibliográfica la disponibilidad de oxígeno es la variable más influyente para su producción (Celinska y Grajek, 2009; Ji y col., 2011). A través de esta variable es posible controlar no sólo la producción de 2,3-BD sino también el crecimiento celular, la distribución de los productos de la ruta fermentativa y la respiración, que conduce a la oxidación total del sustrato carbonado a CO₂ (Moo-Young, 1985). Diversos autores sostienen que las condiciones de aireación óptimas para la producción de 2,3-BD deben ser microaerobias, existiendo un estrecho margen de disponibilidad de oxígeno que optimiza su producción (Beronio y Tsao, 1993; Zeng y col., 1994; Petrov y Petrova, 2009; Sun y col., 2009; Sattayasamitsathit y col., 2011).

Para evaluar de forma preliminar la influencia de la presencia de oxígeno en el proceso se llevó a cabo un estudio preliminar con distintas condiciones de disponibilidad de oxígeno. Para conseguirlo, se realizó una batería de 11 experimentos llevados a cabo en botellas de vidrio de volumen de 50 y 100 mL selladas con un tampón con septum, con diferentes volúmenes de trabajo. Cada botella constituye un sistema cerrado, en el que no se permite el intercambio de aire con el exterior. El oxígeno disponible en cada experimento está determinado por la cámara de aire residual que queda por encima del caldo de cultivo en el inicio del experimento. En la Tabla 3.2 se recoge el volumen del reactor, el volumen de trabajo así como el porcentaje de volumen que ocupa la cámara de aire residual respecto al volumen total del reactor (V_{AIRE}). Cabe destacar que el experimento A11, correspondiente al volumen de aire 100%, representa un sistema abierto, donde el tapón con septum ha sido sustituido por un tapón de algodón que permite el intercambio de aire con el exterior durante todo el experimento. Los resultados experimentales relacionados con la composición del caldo de cultivo a las 24 h de experimentación se recogen en la Tabla I.1 del Anexo I.

Tabla 3.2 Planificación experimental para el estudio preliminar de la influencia de la presencia de oxígeno en la ruta metabólica de la bacteria *R. planticola* CECT 843. Condiciones: $T (^{\circ}\text{C}) = 30$; $C_G (\text{g/L}) = 30$; medio de cultivo 1; $N (\text{rpm}) = 175 \text{ rpm}$; tiempo experimentación 24 h.

EXPERIMENTO	$V_{\text{botella}} (\text{mL})$	$V_{\text{medio}} (\text{mL})$	$V_{\text{AIRE}} (\%)$
A1	50	50	18,5
A2	50	40	35,0
A3	50	30	51,0
A4	100	50	63,5
A5	50	20	65,7
A6	100	40	70,8
A7	100	30	78,1
A8	50	10	83,7
A9	100	20	85,4
A10	100	10	92,7
A11	50	10	100,0

En la Figura 3.1 se muestra la distribución de los productos de la ruta metabólica detectados en el caldo de cultivo en función del volumen de aire disponible en la botella empleada como reactor, a las 24 h de experimento. A la vista de dicha Figura, se confirma la importancia de la disponibilidad de oxígeno en el control de la composición final del caldo de cultivo. En las condiciones más anaeróbicas, por debajo del 40% de volumen de aire, el producto principal de la fermentación es etanol. Por encima de este valor, y hasta el 70 % de volumen de aire, el producto principal es ácido láctico. Ambos compuestos son productos típicos de rutas fermentativas anaeróbicas. A partir del 85% de volumen de aire en la botella, la ruta metabólica se desvía hacia la producción de ácido acético y se detecta 2,3-BD. La máxima concentración de 2,3-BD se alcanza en las condiciones más aeróbicas empleadas, el decir, en el experimento A11 correspondiente al ensayo realizado en condiciones totalmente aerobias.

A la vista de los resultados obtenidos en este apartado, se concluye que el régimen de aireación que proporciona los mejores resultados para la producción de 2,3-BD, dentro de las alternativas estudiadas, es el correspondiente a las condiciones aerobias. Por tanto, se fija como dispositivo experimental para los estudios posteriores relacionados con la elección del biocatalizador del proceso, la botella de 50 mL de volumen con 10 mL de volumen de trabajo con tampón de algodón, que permite el intercambio de oxígeno con el exterior del reactor.

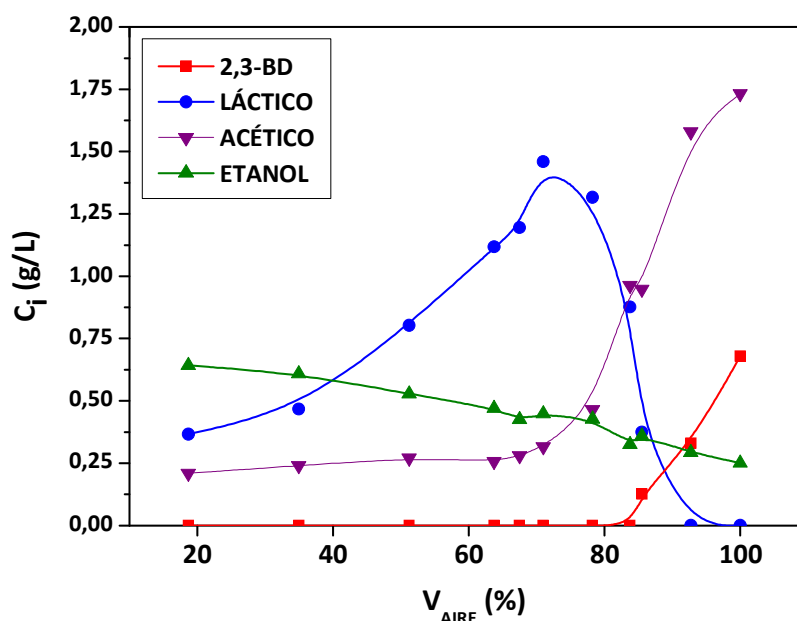


Figura 3.1 Distribución de los metabolitos de la ruta de degradación del glicerol para la bacteria *R. planticola* CECT 843 en función del oxígeno disponible, relacionado con el volumen que ocupa la cámara de aire en cada experimento respecto al volumen total de la botella.

El presente bloque experimental únicamente fue realizado para la cepa *R. planticola*. Se amplió la validez de las conclusiones extraídas de este estudio a la cepa *R. terrigena*, tras un pequeño ensayo de comprobación para este microorganismo. Debido a la importancia de esta variable en el Capítulo 4 se retomará el estudio de la influencia de oxígeno en mayor grado de detalle y profundidad.

3.1.2 ENSAYOS DE PRODUCCIÓN DE 2,3-BD EMPLEANDO DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO SINTÉTICOS

Una de las partidas con mayor peso en el balance económico de los procesos biotecnológicos industriales es el coste del medio de cultivo. En este sentido, la tendencia general para minimizar costes es emplear medios de cultivo sintético, caracterizados porque en su formulación se emplean únicamente sales inorgánicas y/o orgánicas. La ventaja de los medios de cultivo sintéticos no reside únicamente en que el precio de las sales que lo constituyen es menor que los preparados de derivados animales o vegetales que conforman los medios de cultivo complejos, sino también en que su composición química se puede definir cuantitativamente de forma exacta, lo que permite reducir fuentes de variabilidad en la calidad del producto. Sin embargo, debido a los requerimientos nutricionales de algunos microorganismos, en ocasiones es necesario recurrir a medios de cultivo semisintéticos, que

contienen algún extracto orgánico complejo necesario como factor de crecimiento, tales como extracto de levadura y lactoalbúmina.

Como punto de comienzo para el desarrollo de la biotransformación de glicerina en 2,3-BD se realizó una revisión de los medios de cultivo sintéticos utilizados en los trabajos del mismo campo publicados previamente. Cada uno de los autores emplea un medio de cultivo diferente, formulado con distintas sales inorgánicas y algunos suplementos orgánicos de carácter complejo. Cabe destacar que, aunque las concentraciones exactas varían, en todas las investigaciones encontradas gobierna la tendencia general de la formulación del medio de cultivo a partir de diferentes sales de fósforo y sulfatos y el empleo mayoritario de amonio como fuente de nitrógeno. En cuanto a los cationes empleados, es generalizada la adición de metales como magnesio, calcio, cobalto, hierro y cobre, algunos de ellos en concentraciones traza (Petrov y Petrova, 2009; Huang y col., 2013; Metsoviti y col., 2012; Yang y col., 2013; Yang y col. 2014a y b; Yen y col., 2014; Cho y col., 2015).

En el presente trabajo se han empleado dos medios de cultivo sintéticos para evaluar la capacidad productora de cada uno de las cepas empleadas enumerados a continuación. La composición de cada medio se definió previamente en el Capítulo *Parte experimental*.

- **Medio 1** es el medio de cultivo empleado para la producción de 2,3-BD a partir de glicerina con *K. pneumoniae* G31 (Petrov y Petrova, 2009; Petrov y Petrova 2010). Debido a los resultados brillantes publicados por estos autores se consideró interesante realizar un ensayo con los biocatalizadores empleados en este estudio. Se trata de un medio sintético enriquecido con una disolución de microelementos, compuesta por distintos metales.
- **Medio 2** corresponde con el medio mínimo M9 2x, ampliamente utilizado en microbiología, siendo numerosos los trabajos publicados que emplean este medio para llevar a cabo la revalorización de la glicerina por vía biotecnológica (Hiremath y col., 2011; Shen y col., 2012; Huang y col., 2013; Yang y col., 2014).

En ambos casos, ha sido necesario enriquecer el medio de cultivo con una pequeña cantidad de extracto de levadura (1,5 g/L), producto rico en vitaminas del complejo B, aminoácidos y otros factores de crecimiento. En el siguiente Apartado se estudiará la posibilidad de reducir e incluso eliminar este compuesto complejo, que eleva el coste del medio de cultivo. En la Tabla 3.3 se muestra la planificación experimental realizada, para cada uno de los biocatalizadores en estudio y los resultados experimentales de los mismos se encuentran recogidos en la Tabla I.2 del Anexo I.

Tabla 3.3 Planificación experimental para los ensayos de producción de 2,3-BD empleando distintos medios de cultivo sintéticos, para cada una de las cepas empleadas como biocatalizador del proceso. Condiciones: N (rpm) = 175; T (°C) = 30; C_G (g/L) = 30; Reactor: botellas de 50 mL; Volumen de trabajo: 10 mL; Condiciones aerobias.

Cepa	EXPERIMENTO	Medio de cultivo
<i>R. planticola</i> CECT 843	A12	Medio 1
	A13	Medio 2
<i>R. terrigena</i> CECT 4519	A14	Medio 1
	A15	Medio 2

En la Figura 3.2 se ha representado la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de 2,3-BD en los experimentos realizados con cada uno de los medios de cultivo evaluados para las cepas *R. planticola* (1) y *R. terrigena* (2). Las tendencias observadas son similares en las dos cepas. La evolución del crecimiento bacteriano no se ve afectada significativamente por las diferencias de composición de los medios de cultivo empleados. Sin embargo, la evolución del pH es diferente en cada experimento, alcanzando valores más ácidos cuando se emplea el medio 1, donde el pH alcanza valores inferiores a 4 y a 5 para las cepas *R. planticola* y *R. terrigena*, respectivamente. La caída drástica de pH observada en estos experimentos se debe a que este medio de cultivo no está compuesto por ningún par de sales que actúen como tampón, a diferencia de lo que ocurre en el medio 2, donde el tampón fosfato permite que el descenso de pH experimentado sea más lento y moderado.

El consumo de sustrato y la producción de 2,3-BD también están influidos por el medio de cultivo empleado, posiblemente debido a las tendencias anteriormente descritas de la evolución de pH. Ninguno de los dos biocatalizadores es capaz de consumir totalmente la fuente de carbono cuando se emplea medio 1. El cese del consumo del sustrato carbonado coincide con la bajada de pH. Este hecho deja de manifiesto la existencia de algún mecanismo de inhibición por pH en el sistema, fenómeno que será estudiado en profundidad en el Capítulo 4. Cuando se emplea medio mínimo 2, se alcanza el consumo total del sustrato.

La concentración de 2,3-BD producida es menor cuando se utiliza el medio 1. Si bien no se observa un cese en la producción cuando se alcanza el valor mínimo de pH registrado en cada caso, sí se manifiesta un descenso significativo de la velocidad de producción de 2,3-BD.

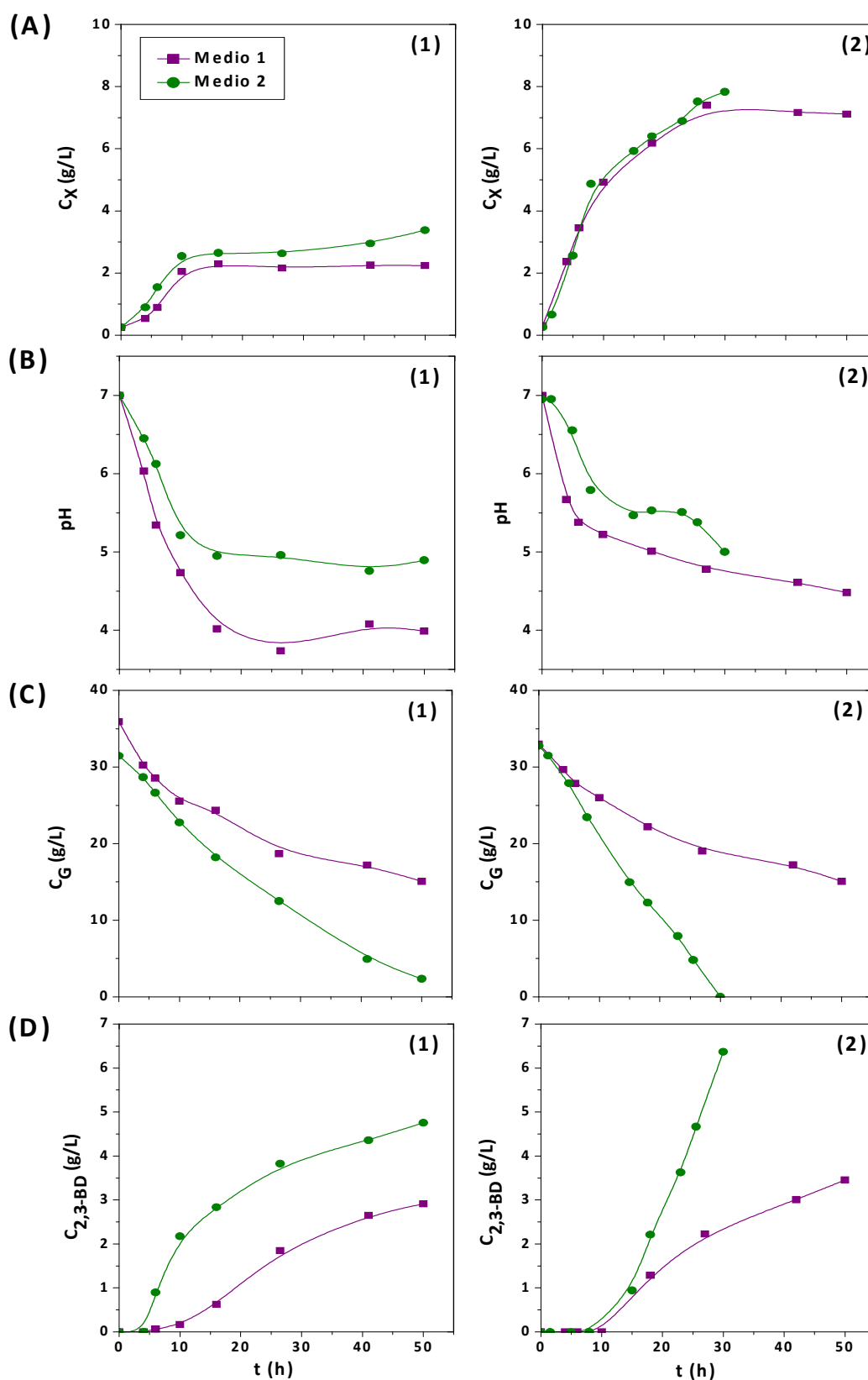


Figura 3.2 Evolución de (A) la concentración de biomasa, (B) pH, (C) concentración de glicerina y (D) concentración de 2,3-BD en los experimentos realizados con los diferentes medios de cultivo sintéticos evaluados con cada una de las cepas estudiadas: (1) *R. planticola* CECT 843 y (2) *R. terrigena* CECT 4519.

Con todo lo expuesto anteriormente, se decidió emplear el medio 2 como medio de cultivo del bioproceso. El presente trabajo se centra en desarrollar aquellos aspectos del bioproceso requeridos para su implantación a nivel industrial. Se consideró que queda fuera del alcance del mismo determinar la optimización de la composición del medio de cultivo, a excepción de algunos complementos nutricionales que pueden favorecer la producción de 2,3-BD y la concentración de extracto de levadura, debido al coste en el proceso que deriva del uso del mismo. Este estudio se desarrollará en el Apartado 3.2 de este Capítulo.

Por último, a la vista de los resultados expuestos en este Apartado, se puede realizar una comparación entre los dos microorganismos empleados como biocatalizador. Como puede observarse en la Figura 3.2, la concentración de biomasa máxima alcanzada de *R. terrigena* es muy superior a la alcanzada por *R. planticola*, siendo aproximadamente 8 g/L en el primer caso y 3 g/L en el segundo. Cuando se emplea el medio de cultivo 2, la velocidad de consumo de sustrato carbonado también es muy diferente: *R. planticola* consume toda la glicerina en, aproximadamente, 55 h, mientras que *R. terrigena* lo hace en sólo 30h. Por último, la capacidad productora de cada cepa en las condiciones de operación empleadas apunta a que en la selección del biocatalizador se debe optar por *R. terrigena*, productora de aproximadamente 6,5 g/L de 2,3-BD frente a 5 g/L que produce *R. planticola*.

Para poder tomar decisiones concluyentes en torno a la selección del biocatalizador del proceso de producción de 2,3-BD a partir de glicerina se desarrollará un estudio comparativo en el Apartado 3.2, en el que se estudiará la influencia de algunas condiciones de operación en la producción de cada una de las cepas así como el empleo de glicerina pura y glicerol crudo proveniente del proceso de producción de biodiésel, como fuente de carbono de la fermentación. De las conclusiones de dicho estudio se tomará la decisión del biocatalizador del proceso que se desarrolla en la presente Memoria.

3.1.3 DESARROLLO DEL PROTOCOLO ESTANDARIZADO DE OBTENCIÓN DEL BIOCATALIZADOR EN LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BD

El Grupo de Investigación *Físicoquímica de los Procesos Industriales y Medioambientales* de la Universidad Complutense de Madrid, donde se enmarca la presente investigación, tiene una amplia experiencia en el estudio y desarrollo de bioprocesos. Fruto de este extenso conocimiento, se ha demostrado que un protocolo estandarizado de conservación y crecimiento del biocatalizador es fundamental para la obtención de resultados experimentales reproducibles y repetitivos en sistemas microbianos.

En el presente trabajo se ha aplicado la metodología que el Grupo de Investigación ha implementado a lo largo de años de trabajo con microorganismos (Martín y col., 2004; Martín y col., 2005; Olmo, 2004; Galdeano, 2007; Martínez, 2013; Escobar, 2013). En la Figura 3.3 se muestra, de forma esquematizada, el procedimiento experimental que ha sido empleado para el mantenimiento y etapas de crecimiento previas necesarias para la obtención del biocatalizador, cuya información más detallada se describió previamente en el Capítulo *Parte experimental*

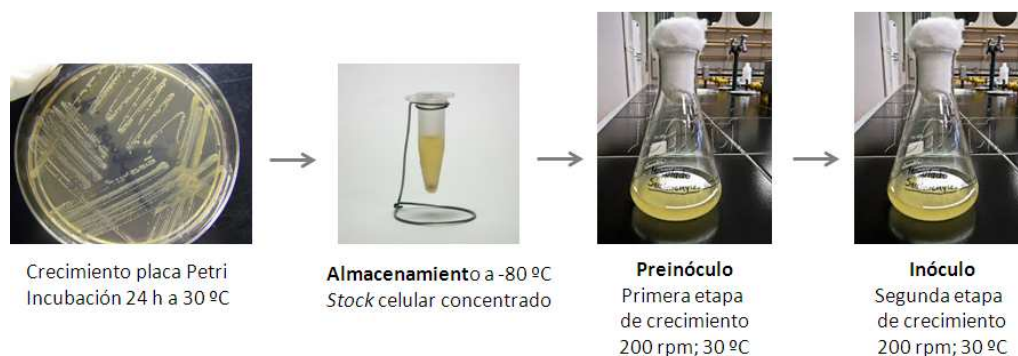


Figura 3.3 Protocolo experimental estándar seguido para el mantenimiento y obtención del biocatalizador en este trabajo.

A partir de la placa de LB-Agar donde se recibieron las cepas bacterianas, se prepara un *stock* concentrado de cada uno de los microorganismos, conservándose a -80 °C en una disolución de glicerol al 50% (v/v) en suero salino [0,9% (p/p)] hasta el momento de ser empleado. La obtención del biocatalizador se realiza en dos etapas sucesivas de crecimiento en matraz Erlenmeyer, denominadas preinóculo e inóculo. La duración de cada etapa viene marcada por el tiempo necesario para alcanzar la mitad de la fase exponencial del crecimiento bacteriano en las condiciones de operación empleadas. Esta metodología asegura la adaptación celular al medio de cultivo de forma controlada, que permite alcanzar condiciones metabólicas idóneas y reproducibles.

Para el desarrollo del protocolo estandarizado de obtención del biocatalizador, fue necesario determinar la curva de crecimiento de cada una de las etapas mediante el seguimiento de la evolución de la concentración de biomasa. La planificación experimental realizada se muestra en la Tabla 3.4. Los resultados experimentales se han recogido en la Tabla I.3 del Anexo I. Asimismo se han representado gráficamente en la Figura 3.4. La fase de latencia en la etapa de preinóculo es mayor que en la etapa de inóculo, como consecuencia del tiempo de adaptación al medio que requieren las células en la primera etapa de crecimiento después de la etapa de almacenamiento. Por tanto, el tiempo necesario para alcanzar la mitad de la fase exponencial en la etapa de preinóculo es mayor que en la segunda de las fases.

Tabla 3.4 Planificación experimental planteada para la determinación de las curvas de crecimiento de las etapas de obtención del biocatalizador preinóculo e inóculo. Condiciones: N (rpm) = 200; T (°C) = 30; C_G (g/L) = 30; medio de cultivo 2; Reactor: matraz Erlenmeyer de 250 mL; Volumen de trabajo: 50 mL; Condiciones aerobias.

Cepa	EXPERIMENTO	Etapas de crecimiento	C_{x0} (g/L)
<i>R. planticola</i> CECT 843	A16	Preinóculo	0,10
	A17	Inóculo	0,25
<i>R. terrigena</i> CECT 4519	A18	Preinóculo	0,10
	A19	Inóculo	0,25

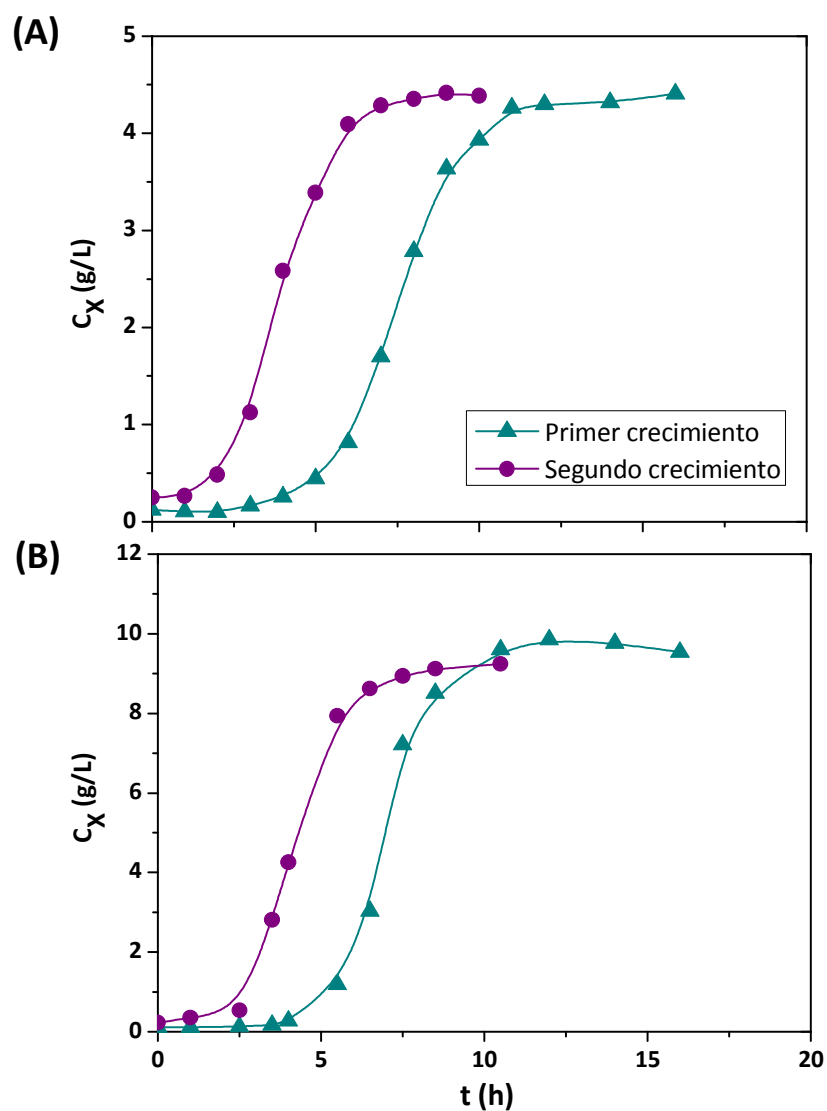


Figura 3.4 Evolución de la concentración de biomasa en las etapas de crecimiento de preinóculo e inóculo de la cepa **(A)** *R. planticola* CECT 843 y **(B)** *R. terrigena* CECT 4519.

A la vista de las citadas Figuras, se establece que la duración de las etapas de crecimiento para la obtención del biocatalizador formado por la cepa *R. planticola* CECT 843 son 8 y 4h, respectivamente, mientras que en el caso de la cepa de *R. terrigena* CECT 4519 la duración es 7 y 4h, respectivamente.

3.2 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN

El objeto del presente Apartado es evaluar la influencia de algunas condiciones de operación con la finalidad de maximizar el rendimiento y la productividad de 2,3-BD. Para alcanzarlo, se decidió plantear un diseño de experimentos, herramienta estadística que permite evaluar la influencia de diferentes factores en un proceso minimizando el volumen de experimentos, disminuyendo por tanto el coste de la investigación y el tiempo necesario para realizarla. Se planteó un diseño de experimentos siguiendo la metodología Taguchi, detallada minuciosamente en el Capítulo 2 *Parte experimental*.

Para la selección de los factores a estudiar en el diseño de experimentos se debe identificar en primer lugar cuáles son las variables más influyentes en la producción bacteriana de 2,3-BD. La importancia de la aireación y el pH se resalta en todos los trabajos publicados que revisan el proceso (Moo-Young, 1985; Garg y Jain, 1995; Celinska y Grajek, 2009; Ji y col., 2011). Sin embargo, el estudio de estas variables se realizará en el siguiente Capítulo, donde el dispositivo experimental empleado para llevar a cabo la fermentación (biorreactor) permite el seguimiento y control preciso de las mismas. Por tanto, los factores seleccionados para este estudio son aquellos cuya influencia se puede evaluar sin dificultad en el dispositivo experimental empleado (botellas de 50 mL agitadas en incubadora de mesa). Tanto los factores estudiados como el nivel de los mismos se incluyen en la Tabla 3.5 y la justificación de su elección se realiza a continuación.

Tabla 3.5 Factores estudiados en el diseño de experimentos Taguchi y los niveles de los mismos para el estudio de la producción de 2,3-BD a partir de glicerina.

FACTOR		Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
A	Temperatura (°C)	26	28	30	33
	Ácido Cítrico (g/L)	-	0,42	-	0,21
B	Ácido Acético (g/L)	-	-	0,42	0,21
	Extracto de Levadura (g/L)	0,0	0,5	1,0	1,5
C					

- **Factor A: Temperatura.** Esta variable es de gran importancia en todos los procesos biotecnológicos, ya que la temperatura ambiente afecta intensamente a la actividad enzimática de los microorganismos unicelulares. El rango de temperatura óptimo para la producción de 2,3-BD está entre 30 y 35 °C, coincidiendo con el intervalo de mayor crecimiento celular (Garg y Jain, 1995). Los niveles de temperatura estudiados se encuentran entre 26 y 33 °C, valores fijados en torno a 30 °C, temperatura óptima de crecimiento de las bacterias estudiadas (CECT).
- **Factor B: Ácidos orgánicos.** La adición de algunos ácidos orgánicos puede actuar como inductor de la ruta metabólica. Durante la biosíntesis de 2,3-BD, además de nutrientes esenciales para el crecimiento y mantenimiento celular, algunos aditivos exógenos, tales como vitaminas y trazas de metales, pueden ser añadidos para aumentar la producción.
 - Diversos autores señalan que la producción de 2,3-BD está acoplada a la de **ácido acético**, induciendo la presencia de acetato la actividad de las enzimas implicadas en la ruta metabólica (Johansen y col., 1975; Yu y Sadler, 1983; Nakashimada y col., 2000; Petrov y Petrova, 2009).
 - Otros trabajos emplean **ácido cítrico** o sal de citrato para la formulación del medio de cultivo (Yen y col., 2014; Perego y col. 2003; Sun y col. 2009; Petrov y Petrova, 2009; Yang y col., 2013; Wong y col., 2014; Tsvetanova y col., 2014). Las investigaciones realizadas en el Grupo de Investigación en otros procesos biotecnológicos han demostrado que la adición de ácidos orgánicos intermediarios del ciclo de Krebs permiten la regeneración del poder reductor NADH a partir de NAD⁺ (Martínez, 2013). Este fenómeno es interesante de estudiar en la biosíntesis de 2,3-BD, cuya ruta metabólica de síntesis requiere NADH en varias etapas de la misma.

En el diseño de experimentos se estudió la influencia de la adición de ácido acético y/o ácido cítrico (C_D/C_A) en el medio de cultivo así como la posibilidad de no añadir ninguno de estos compuestos, tal y como muestra la Tabla 3.5 para los niveles estudiados del Factor B.

- **Factor C: Concentración de extracto de levadura.** Debido al elevado contenido en nitrógeno presente en el material proteico, el extracto de levadura es empleado frecuentemente como fuente de nitrógeno para aumentar el crecimiento celular y la producción del 2,3-BD. Sin embargo, el elevado coste de este producto limita su uso en grandes cantidades en procesos industriales (Laube y col., 1984). En vistas a la implantación del proceso a nivel industrial, se debe intentar reducir el empleo de

extracto de levadura, debido a razones económicas. Por ello, se consideró importante estudiar la influencia de la reducción de la concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo en la producción de 2,3-BD, con el fin de determinar si es posible minimizar la concentración de este compuesto.

El objetivo del diseño de experimentos es determinar la influencia de los factores anteriormente citados en el proceso de producción de 2,3-BD. Para alcanzarlo, se han definido dos funciones objetivo (y_1 e y_2) correspondientes al rendimiento ($Y_{2,3-BD}$) y la productividad de 2,3-BD ($P_{2,3-BD}$), definidas en las ecuaciones 3.1 y 3.2, respectivamente. La metodología Taguchi define el tratamiento de los resultados para determinar cuál es el nivel de cada uno de los factores estudiados que maximizan la respuesta de cada una de las dos funciones objetivo.

$$y_1: Y_{2,3-BD} \left(g_{2,3-BD} / g_G \right) = C_{2,3-BD}^{max} / C_G^0 \quad [3.1]$$

$$y_2: P_{2,3-BD} \left[g_{2,3-BD} / (L \cdot h) \right] = C_{2,3-BD}^{max} / t \quad [3.2]$$

La planificación experimental realizada en el presente estudio viene determinada por la matriz ortogonal definida por Taguchi para un número de factores y niveles determinado. Así, para 3 factores con 4 niveles, se propone la matriz ortogonal denominada L_{16} , compuesta por 16 experimentos. Cada experimento viene definido por unas condiciones de operación determinadas, correspondientes a la combinación de un nivel determinado de cada factor, tal y como recoge la Tabla 3.6. El estudio de la influencia de las condiciones de operación anteriormente descritas se desarrolló para los dos biocatalizadores en estudio. La planificación experimental llevada a cabo se incluye en las Tablas 3.7 A y B para las cepas (A) *R. planticola* CECT 843 y (B) *R. terrigena* CECT 4519, respectivamente. En la Tabla I.4 del Anexo I se recogen los resultados obtenidos en términos de rendimiento y productividad de 2,3-BD para cada uno de los 16 experimentos que componen el arreglo ortogonal L_{16} , para las cepas en estudio. Cabe destacar que el tiempo de duración de cada experimento es el necesario para conseguir el consumo total de la fuente de carbono, momento en el que la concentración de 2,3-BD es máxima. A partir de estos datos experimentales y según lo expuesto sobre el tratamiento matemático de los datos en la metodología Taguchi, incluido en el Capítulo 2 *Parte experimental* de la presente Memoria, se puede determinar cuál es el nivel de cada uno de los factores estudiados que maximizan las funciones-objetivo definidas. En las Figuras 3.5 y 3.6 se han representado gráficamente la Relación Señal Ruido (SNR) de cada factor en función del nivel del mismo para poder evaluar la influencia relativa de cada uno de los factores estudiados en las funciones objetivo escogidas.

Tabla 3.6 Matriz ortogonal L_{16} del diseño de experimentos Taguchi para 3 factores con 4 niveles.

EXPERIMENTO																
FACTOR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4
B	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C	1	2	3	4	2	1	4	3	3	4	1	2	4	3	2	1

Tabla 3.7 Planificación experimental para el estudio de las condiciones de operación mediante el diseño de experimentos Taguchi empleando como biocatalizador **(A)** *R. planticola* CECT 843 y **(B)** *R. terrigena* CECT 4519. Condiciones: N (rpm) = 175; T (°C) = 30; C_G (g/L) = 30; Medio de cultivo 2; Reactor: botellas de 50 mL; Volumen de trabajo: 10 mL; Condiciones aerobias.

(A)				(B)			
		FACTOR				FACTOR	
EXPERIMENTO	T (°C)	C_C/C_A (g/L)	YE (g/L)	EXPERIMENTO	T (°C)	C_C/C_A (g/L)	YE (g/L)
P1	26	0,00/0,00	0,0	T1	26	0,00/0,00	0,0
P2	26	0,42/0,00	0,5	T2	26	0,42/0,00	0,5
P3	26	0,00/0,42	1,0	T3	26	0,00/0,42	1,0
P4	26	0,21/0,21	1,5	T4	26	0,21/0,21	1,5
P5	28	0,00/0,00	0,5	T5	28	0,00/0,00	0,5
P6	28	0,42/0,00	0,0	T6	28	0,42/0,00	0,0
P7	28	0,00/0,42	1,5	T7	28	0,00/0,42	1,5
P8	28	0,21/0,21	1,0	T8	28	0,21/0,21	1,0
P9	30	0,00/0,00	1,0	T9	30	0,00/0,00	1,0
P10	30	0,42/0,00	1,5	T10	30	0,42/0,00	1,5
P11	30	0,00/0,42	0,0	T11	30	0,00/0,42	0,0
P12	30	0,21/0,21	0,5	T12	30	0,21/0,21	0,5
P13	33	0,00/0,00	1,5	T13	33	0,00/0,00	1,5
P14	33	0,42/0,00	1,0	T14	33	0,42/0,00	1,0
P15	33	0,00/0,42	0,5	T15	33	0,00/0,42	0,5
P16	33	0,21/0,21	0,0	T16	33	0,21/0,21	0,0

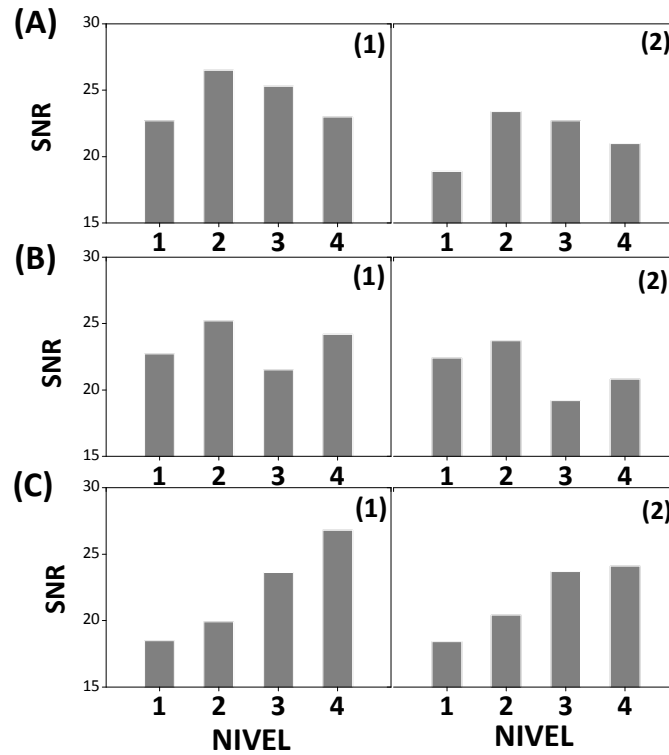


Figura 3.5 Relación Señal Ruido para cada factor estudiado (A) factor A, (B) factor B y (C) factor C para cada una de las funciones objetivo definidas (1) rendimiento y (2) productividad, cuando se emplea *R. planticola* CECT 843 como biocatalizador.

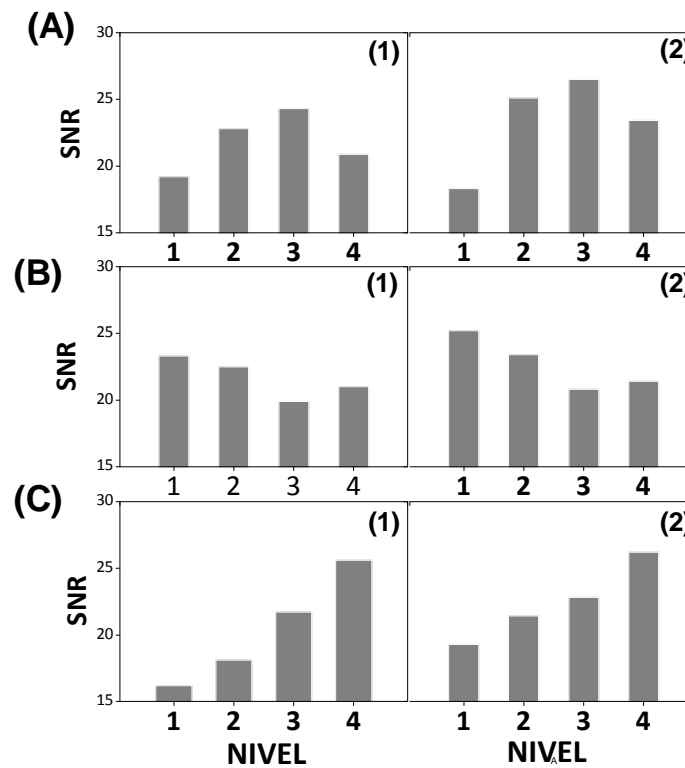


Figura 3.6 Relación Señal Ruido para cada factor estudiado (A) factor A, (B) factor B y (C) factor C para cada una de las funciones objetivo definidas (1) rendimiento y (2) productividad, cuando se emplea *R. terrigena* CECT 4519 como biocatalizador.

Las tendencias observadas para ambos microorganismos son similares. El factor con una influencia más acusada en las dos funciones objetivo estudiadas (rendimiento y productividad) es la concentración de extracto de levadura del medio de cultivo. En todos los casos, a mayor concentración, mayor respuesta SNR. La temperatura tiene también una gran influencia en el proceso. En este caso, la SNR experimenta un máximo en el intervalo estudiado. El máximo se observa en el nivel 2 estudiado, correspondiente a 28 °C, para *R. planticola* y en el nivel 3, correspondiente a 30 °C para *R. terrigena*. Por último, la influencia de la adición o no de ácido acético y/o cítrico presenta menor influencia en el rendimiento y productividad, en la concentración y alternativas estudiadas.

El fin último del diseño de experimentos es maximizar la respuesta de la función-objetivo definida, el nivel de cada uno de los factores que permite alcanzar el máximo valor es aquel que proporciona la SNR mayor. Según este criterio, el nivel de cada factor que maximiza las funciones estudiadas se ha recogido en la Tabla 3.8. Cabe destacar que para las dos cepas, el nivel de cada factor que maximiza y_1 e y_2 es el mismo, comprobándose así que dichas condiciones de operación no permiten únicamente alcanzar mayor concentración de 2,3-BD (variable relacionada con el rendimiento) sino hacerlo en menos tiempo (variable relacionada con la productividad).

Tabla 3.8 Nivel de cada uno de los factores estudiados que maximizan las dos funciones objetivo estudiadas.

FACTOR		<i>R. planticola</i>		<i>R. terrigena</i>	
		y_1	y_2	y_1	y_2
A	Temperatura (°C)	28	28	30	30
B	Ácido Cítrico (g/L)	0,42	0,42	0,0	0,0
	Ácido Acético (g/L)	0,0	0,0	0,0	0,0
C	Extracto de Levadura (g/L)	1,5	1,5	1,5	1,5

La última etapa de la metodología Taguchi consiste en la realización del experimento de confirmación, que permite ratificar si el análisis del diseño experimental conduce realmente a la optimización de las condiciones de operación. Debido a que las condiciones de operación que maximizan el rendimiento y la productividad de 2,3-BD son las mismas, sería necesario realizar un único experimento de confirmación para cada una de las cepas bacterianas, cuya planificación se incluye en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9 Planificación experimental para el experimento de confirmación del diseño Taguchi empleando como biocatalizador **(A)** *R. planticola* CECT 843 y **(B)** *R. terrigena* CECT 4519. Condiciones: N (rpm) = 175; T (°C) = 30; C_G (g/L) = 30; Medio de cultivo 2; Reactor: botellas de 50 mL; Volumen de trabajo: 10 mL; Condiciones aerobias.

(A)				(B)			
FACTOR				FACTOR			
EXPERIMENTO	T (°C)	C_G/C_A (g/L)	YE (g/L)	EXPERIMENTO	T (°C)	C_G/C_A (g/L)	YE (g/L)
P17	28	0,42/0,00	0,0	T17	30	0,00/0,00	1,5

En las Figuras 3.7 y 3.8 se muestra la comparación de los valores de rendimiento y productividad alcanzados en cada uno de los experimentos que componen el arreglo ortogonal L16 y el experimento de confirmación de las condiciones de operación que maximizan ambas variables, para los biocatalizadores empleados: *R. planticola* y *R. terrigena*, respectivamente. Como puede observarse para las dos cepas empleadas, la respuesta obtenida en términos de rendimiento y productividad para el experimento de confirmación (P17 y T17) es igual o superior a la obtenida en los experimentos del arreglo ortogonal, demostrando así que a través de la metodología Taguchi se ha conseguido maximizar el valor de las funciones objetivo definidas.

A la luz de los resultados comentados en este epígrafe, se fija como temperatura de operación 28 y 30 °C cuando se emplea *R. planticola* y *R. terrigena* como biocatalizador, respectivamente. Así mismo, la suplementación con ácido cítrico (0,42 g/L) del medio de cultivo 2 queda fijada para los experimentos realizados con *R. planticola* y la adición de 1,5 g/L de extracto de levadura para ambas cepas.

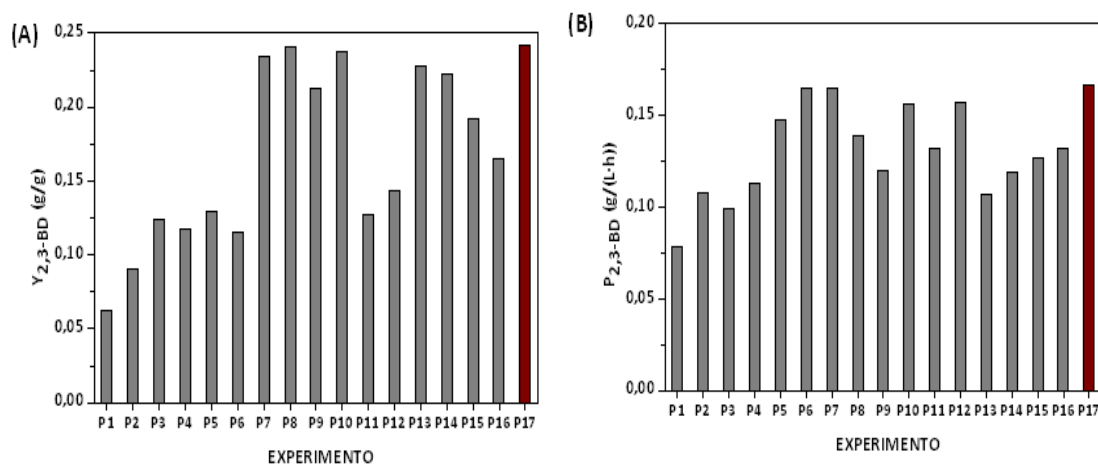


Figura 3.7 Comparación del **(A)** rendimiento y **(B)** productividad alcanzados en cada uno de los experimentos del arreglo ortogonal L_{16} y el experimento de confirmación, cuando se emplea *R. planticola* CECT 843 como biocatalizador.

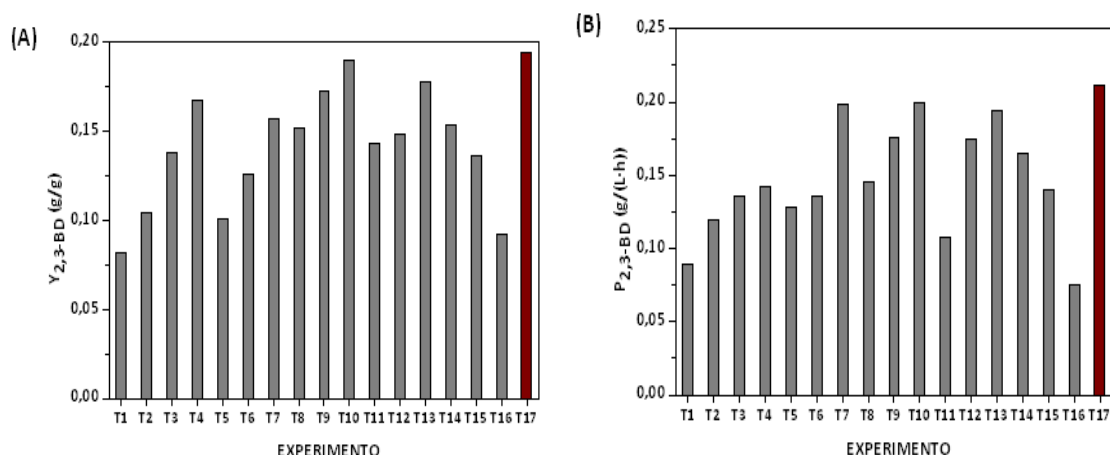


Figura 3.8 Comparación del (A) rendimiento y (B) productividad alcanzados en cada uno de los experimentos del arreglo ortogonal L_{16} y el experimento de confirmación, cuando se emplea *R. terrigena* CECT 4519 como biocatalizador.

Las condiciones de operación establecidas como óptimas para la producción en este Apartado serán empleadas en el Apartado siguiente para la comparación del comportamiento microbiano para la elección del mejor biocatalizador del proceso.

3.3 COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LOS DISTINTOS BIOCATALIZADORES EMPLEANDO GLICERINA DE DISTINTA PROCEDENCIA COMO FUENTE DE CARBONO

El objeto del presente Capítulo es llevar a cabo la elección del biocatalizador más adecuado para el proceso de producción de 2,3-BD a partir de glicerina. Para alcanzarlo, el trabajo de los anteriores Apartados se ha centrado en el desarrollo de los protocolos de mantenimiento y crecimiento del biocatalizador así como la determinación de algunas de las condiciones de operación que favorecen la producción de 2,3-BD. Haciendo uso de lo anteriormente expuesto, se llevará a cabo un estudio comparativo del comportamiento de cada uno de los biocatalizadores objeto en estudio para la determinación de la cepa bacteriana que se considera más adecuada para ser empleada como biocatalizador.

Para profundizar en la comparación del comportamiento de cada una se consideró importante evaluar la capacidad productora de las cepas empleando, además de glicerina pura como sustrato carbonado, diferentes muestras de glicerina cruda, extraídas de distintos puntos de la planta de producción de biodiésel, permitiendo así evaluar de forma preliminar si sería posible emplear directamente este residuo de la biorrefinería como materia prima, para conseguir rebajar los costes del proceso de producción de 2,3-BD así como mejorar el balance

económico de producción de biodiésel. La planificación experimental realizada se encuentra recogida en la Tabla 3.10, compuesta por 3 experimentos para cada uno de los biocatalizadores, diferenciados entre sí por la naturaleza de la fuente de carbono empleada. Los resultados experimentales obtenidos en relación a la evolución de la concentración de biomasa, pH así como el consumo de sustrato carbonado y producción de metabolitos se encuentran recogidos en las Tablas I.5 e I.6 del Anexo I.

Tabla 3.10 Planificación experimental planteada en torno a la comparación del comportamiento de las dos cepas estudiadas como biocatalizador del proceso: experimentos con distintos tipos de glicerina (pura y cruda) en las condiciones determinadas como óptimas en el diseño de experimentos Taguchi. Condiciones: N (rpm) = 175; T (°C) = 30; C_G (g/L) = 30; Reactor: botellas de 50 mL; Volumen de trabajo: 10 mL; Medio de cultivo 2; Condiciones aerobias.

Cepa	EXPERIMENTO	Tipo de glicerina
<i>R. planticola</i> CECT 843	P17	Pura
	P18	Cruda (muestra 1)
	P19	Cruda (muestra 2)
<i>R. terrigena</i> CECT 4519	T17	Pura
	T18	Cruda (muestra 1)
	T19	Cruda (muestra 2)

En la Figura 3.10 se han representado gráficamente la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de 2,3-BD para los experimentos realizados con cada una de las fuentes de carbono y los diferentes biocatalizadores empleados en las condiciones determinadas como óptimas según el diseño de experimentos realizado. En lo que se refiere a la influencia del uso de glicerina pura y glicerina cruda proveniente del proceso de producción de biodiésel, cabe destacar positivamente que las diferencias observadas en el sistema cuando se usa una u otra no son muy significativas. En lo que respecta al crecimiento bacteriano y la evolución del pH, el uso del residuo como sustrato carbonado no genera grandes diferencias en dichas evoluciones.

Respecto a la evolución de la concentración del sustrato carbonado, en general, el tiempo necesario para alcanzar el consumo total del mismo es ligeramente mayor cuando se emplea la fuente de carbono cruda, para los dos biocatalizadores. La misma tendencia se observa en la producción de 2,3-BD. La velocidad de producción observada es similar en todos los casos así como el inicio de la producción. Sin embargo, debido a que la producción de 2,3-BD

está ligada a la disponibilidad de sustrato carbonado, cabe destacar que en los experimentos realizados con glicerol crudo, que tarda más tiempo en consumirse totalmente, la concentración de 2,3-BD alcanzada es ligeramente superior. Este hecho deja patente que es posible desarrollar potencialmente el proceso de producción de 2,3-BD mediante la revalorización de la glicerina cruda extraída como residuo de la industria del biodiésel.

Para poder realizar la toma de decisión sobre el biocatalizador del proceso se han recopilado los resultados de rendimiento y productividad de 2,3-BD de cada uno de los experimentos realizados en este Apartado en la Tabla 3.11. En términos de rendimiento, la bacteria *R. planticola* proporciona mejores resultados que *R. terrigena*, sea cual sea el tipo de glicerina utilizada, alcanzando un rendimiento mayor al 25% cuando se emplea la muestra 2 de la glicerina cruda, frente a un 22% alcanzado con *R. terrigena*. Sin embargo, el fenómeno observado cuando se comparan los resultados de productividad es el contrario. Esta variable es de especial importancia ya que está relacionada no sólo con la cantidad de producto producido sino con el tiempo que tarda en hacerlo. A la luz de la Figura 3.10, 1C, 2C, 1D y 2D, se observa que el empleo de *R. terrigena* como biocatalizador conduce a un consumo de glicerina y, por tanto, una producción de 2,3-BD mucho más rápida que *R. planticola*. Debido a que las diferencias observadas respecto a la concentración de 2,3-BD alcanzada no son tan acusadas como las de la velocidad de producción, se concluye que el biocatalizador seleccionado para llevar a cabo el desarrollo del proceso de bioconversión de glicerina a 2,3-BD es *R. terrigena* CECT 4519.

Tabla 3.11 Comparación de los resultados en términos de rendimiento y productividad para cada uno de los experimentos llevados a cabo.

Glicerina	EXPERIMENTO	Cepa	$Y_{2,3-BD}$ (g/g)	$P_{2,3-BD}$ [g/(L·h)]
Pura	P17	<i>R. planticola</i>	0,242	0,167
	T17	<i>R. terrigena</i>	0,194	0,212
Cruda (muestra 1)	P18	<i>R. planticola</i>	0,233	0,181
	T18	<i>R. terrigena</i>	0,208	0,190
Cruda (muestra 2)	P19	<i>R. planticola</i>	0,254	0,139
	T19	<i>R. terrigena</i>	0,219	0,216

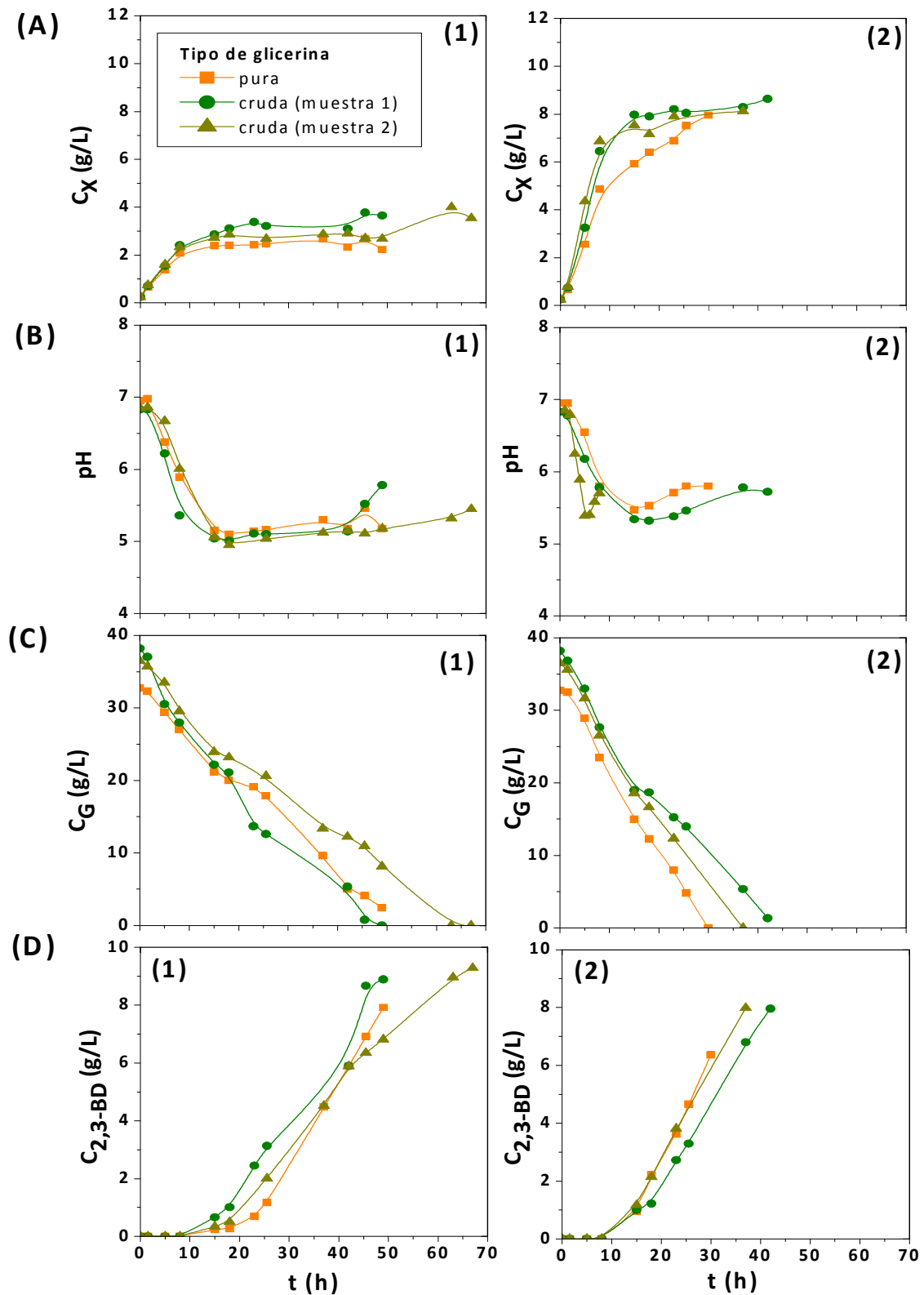


Figura 3.8 Evolución de **(A)** la concentración de biomasa, **(B)** pH, **(C)** la concentración de glicerina y **(D)** la concentración de 2,3-BD en los experimentos realizados en las condiciones determinadas como óptimas mediante el diseño de experimentos Taguchi para cada una de las cepas: **(1)** *R. planticola* CECT 843 y **(2)** *R. terrigena* CECT 4519 con glicerina pura y dos muestras de glicerina cruda.

3.4 BIBLIOGRAFÍA

Bagley, S.; Seidler, R. J. y Brenner, D. J. (1981). *Klebsiella planticola* sp. Nov.: a new species of *Enterobacteriaceae* found primarily in nonclinical environments. *Current Microbiology*, 6: 105-109.

Beron, P. B. y Tsao, G. T. (1993). Optimization of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* through oxygen transfer rate control. *Biotechnology and Bioengineering*, 42: 1263-1269.

Blomquist, K.; Nikkola, M.; Lehtovaara, P.; Suihko, M.; Airaksinen, U.; Straby, K. B.; Knowles, J. K. C. y Penttilä, M. E. (1993). Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology*, 175 (5): 1392-1404.

Celinska, E. y Grajek, W. (2009). Biotechnological production of 2,3-butanediol – Current state and prospects. *Biotechnology Advances*, 27: 715-725.

Cho, S.; Kim, T.; Woo, H. M.; Kim, Y.; Lee, J. y Um, Y. (2015). High production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1. *Biotechnology for Biofuels*, 8: 146-158.

Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). www.cect.org/. Última consulta: Marzo 2016.

Drancourt, M.; Bollet, C.; Carta, A. y Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 925-932.

Escobar, S. (2013). Estudio del transporte y consumo de oxígeno en cultivos bacterianos: estrés hidrodinámico. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Galdeano, C. (2007). Producción de 1,3-propanodiol usando *Klebsiella oxytoca* NRRL B-199: Optimización del medio de cultivo mediante el método Taguchi. Diploma de Estudios Avanzados. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Garg, S. K. y Jain, A. (1995) Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. *Bioresource Technology*, 51: 103-109.

Hiremath, A.; Kannabiran, M. y Rangaswamy, V. (2011). 1,3-Propanediol production from crude glycerol from *Jatropha* biodiesel process. *New Biotechnology*, 28 (1): 19-23.

Huang, C; Jiang, Y.; Guo, G. y Hwang, W. (2013). Method of 2,3-butanediol production from glycerol and acid-pretreated rice straw hydrolysate by newly isolated strains: Pre-evaluation as an integrated biorefinery process. *Bioresource Technology*, 135: 446-453.

Izard, D.; Ferragut, C.; Gavini, F.; Kersters, K.; De Ley, J. y Leclerc, H. (1981). *Klebsiella terrigena*, a new species from soil and water. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31 (2): 116-127.

Ji, X.; Huang, H. y Ouyang, P. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: a state of the art – review. *Biotechnology Advances*, 29: 351-364.

Johansen, L.; Bryn, K. y Stormer, F. C. (1975). Physiological and biochemical role of butanediol pathway in *Aerobacter (Enterobacter) aerogenes*. *Journal of Bacteriology*, 123(3): 1124-1130.

Katznelson, H. I. (1944). Studies with *Bacillus polymyxa*. I. Some factors affecting the fermentation of wheat by *Bacillus polymyxa*. *Canadian Journal of Research*, 22©: 235-240.

Laube, V. M.; Groleau, D. y Martin, S. M. (1984). The effect of yeast extract on the fermentation of glucose on 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnology Letters*, 6 (8): 535-540.

Ledingham, G. A.; Adams, G. A. y Stanier, R. Y. (1945). Production and properties of 2,3-butanediol. I. Fermentation of wheat mashes by *Aerobacillus polymyxa*. *Canadian Journal of Research*, 23F: 48-71.

Nakashimada, Y.; Marwoto, B.; Kashiwamura, T.; Kakizono, T. y Nishio, N. (2000). Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90 (6): 661-664.

Martin, A.B.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2004). Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for dibenzothiophene biodesulfurization for different media compositions. *Energy Fuels*, 18: 851-857.

Martin, A.B.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F. (2005). Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for DBT biodesulfurization: influence of the operational conditions. *Energy Fuels*, 19: 775-782.

Martínez, I. (2013). Biodesulfuración de dibenzotiofeno con *Pseudomonas putida* KTH2: una aproximación al cambio de escala del proceso. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

McCall, K. B. y Georgi, C. E. (1954). The production of 2,3-butanediol by fermentation of sugar beet molasses. *Applied Microbiology*, 2(6): 355-359.

Metsoviti, M.; Paramithiotis, S.; Drosinos, E. H.; Galiotou-Panayotou, M.; Nychas, G. E.; Zeng, A. y Papanikolaou, S. (2012) Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol. *Engineering in Life Science*, 12 (1): 57-68.

Moo-Young, M. (1985).Comprehensive Biotechnology: The principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. Ed. Pergamon Press. Nueva York, pp. 933- 947.

Olmo, C.H. (2004). Biodesulfuración de dibenzotiofeno con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Perego, P.; Converti, A. y Borghi, M. D. (2003). Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology*, 89: 125-131.

Perlman, D. (1944). 2,3-butylene glycol from wood hydrolysates. *Industrial Engineering Chemistry*, 36: 803-804.

Petrov, K. y Petrova, P. (2009). High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 659-665.

Petrov, K. y Petrova, P. (2010). Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 943-949.

Ripoll, V.; de Vicente, G.; Moran, B.; Rojas, A.; Segarra, S.; Montesinos, A.; Tortajada, M.; Ramon, D.; Ladero, M. y Santos, V. E. (2016) Novel biocatalysts for glycerol conversion into 2,3-butanediol. *Process Biochemistry*, 51: 740-748.

Rojas, A. M.; Segarra, S.; Montesinos, A.; Tortajada, M.; Ramón, D.; Santos, V. E.; Ladero, M.; García-Ochoa, F.; Ripoll., V. y Rodríguez, A. (2014) Proceso para la producción de 2,3-butanodiol mediante cepas mejoradas de *Raoultella planticola*. Número de publicación: WO2014013330 A2, 23 de Enero de 2014.

Sattayasamitsathit, S.; Prasertsan, P. y Methacanon, P. (2011). Statistical optimization for simultaneous production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol using crude glycerol by newly bacterial isolate. *Process Biochemistry*, 46: 608-614.

Shen, X.; Lin, Y.; Jain, R.; Yuan, Q. y Yan, Y. (2012). Inhibition of acetate accumulation leads to enhanced production of (R,R)-2,3-butanediol from glycerol in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39: 1725-1729.

Sun, L.; Wang, X.; Dai, J. y Xiu, Z. (2009). Microbial production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82: 847-852.

Tsvetanova, F.; Petrova, P. y Petrov, K. (2014) 2,3-butanediol production from starch by engineered *Klebsiella pneumoniae* G31-A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 2441-2451.

Ward, G. E.; Pettijohn, O. G.; Lockwood, L. B. y Coghill, R. D. (1945). 2,3-butanediol from acid hydrolyzed starch. *Industrial Engineering Chemistry*, 37: 1189-1194.

Wong, C.; Yen, H.; Lin, C. y Chang, J. (2014). Effects of pH and fermentation strategies on 2,3-butanediol production with an isolated *Klebsiella* sp. Zmd30 strain. *Bioresource Technology*, 152: 169-176.

Yang, T.; Rao, Z.; Zhang, X.; Xu, M.; Xu, Z. y Yang, S. (2013). Fermentation of biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*: effects of cosubstrates on 2,3-butanediol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 7651-7658.

Yang, T.; Rathnasingh, C.; Lee, H. J. y Seung, D. (2014). Identification of acetoin reductases involved in 2,3-butanediol pathway in *Klebsiella oxytoca*. *Journal of Biotechnology*, 172: 59-66.

Yang, T.; Rao, Z.; Hu, G.; Zhang, X.; Liu, M.; Dai, Y.; Xu, M.; Xu, Z. y Yang, S. (2015a). Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for redistributing the carbon flux to 2,3-butanediol by manipulating NADH levels. *Biotechnology for biofuels*, 8: 129-138.

Yang, T.; Rao, Z.; Zhang, X.; Xu, M.; Xu, Z. y Yang, S. (2015b). Enhanced 2,3-butanediol production from biodiesel-derived by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbial cell factories*, 14: 122-133.

Yen, H.; Li, F. y Chang, J. (2014). The effects of dissolved oxygen level on the distribution of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol produced from glycerol by an isolated indigenous *Klebsiella* sp. Ana-WS5. *Bioresource Technology*, 153: 374-378.

Yu, E. K. C. y Sadler, J. N. (1983). Fed-batch approach to production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high substrate concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (3): 630-635.

Zeng, A.; Byun, T.; Posten, C. y Deckwer, W. (1994). Use of respiratory quotient as a control parameter for optimum oxygen supply and scale-up of 2,3-butanediol production under microaerobic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 1107-1114.

CAPÍTULO 4

PRODUCCIÓN DE 2,3-BUTANODIOL CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

El objeto de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo del proceso de producción de 2,3-BD mediante la conversión de la glicerina por vía biotecnológica. Las etapas de la metodología general anteriormente descrita para el desarrollo de los bioprocesos se han esquematizado en la Figura 4.1. La primera etapa del mismo se ha llevado a cabo en el Capítulo 3, con la selección de *R. terrigena* CECT 4519 como biocatalizador del proceso, así como con el desarrollo de los protocolos de conservación, mantenimiento y crecimiento celular. El siguiente paso consiste en el estudio a escala de laboratorio de la etapa de producción, para lo cual es necesario llevar a cabo la optimización de las condiciones de operación (temperatura, pH, presión, concentración de biomasa, concentración de nutrientes, etc.), el estudio de la transferencia de materia, la evaluación del posible estrés hidrodinámico y la determinación de la mejor forma de operación (discontinua, semicontinua, continua) (García-Ochoa y Gómez, 2009). A partir de la comprensión del sistema abordada en este punto es posible plantear un modelo cinético de la producción y un modelo físico del sistema, con los que desarrollar un modelo macrocinético, que sirva como punto de partida para realizar el cambio de escala, a planta piloto en primer lugar y, posteriormente, si los resultados obtenidos en ésta son satisfactorios, a escala industrial.

Uno de los puntos clave en el desarrollo de un bioproceso es el referente al estado del biocatalizador a emplear, en términos de capacidad de replicación celular del mismo. Se distingue así entre biocatalizadores compuestos por células en crecimiento y biocatalizadores compuestos por células en estado de reposo o *resting cells*. El empleo de células en crecimiento se caracteriza porque el consumo del sustrato carbonado suministrado se dirige no sólo a la producción del producto de interés sino también es utilizado como fuente de carbono para la

autorreplicación del catalizador y como fuente energética para el mantenimiento del mismo. Asimismo, atendiendo a la relación entre la fase del crecimiento y el momento en el que producción del metabolito de interés tiene lugar, pueden diferenciarse entre productos completa, parcialmente o no asociados al crecimiento celular, tal y como refleja la Figura 4.2. El objeto del presente capítulo es profundizar en el desarrollo del proceso empleando células de *R. terrigena* en crecimiento como biocatalizador.

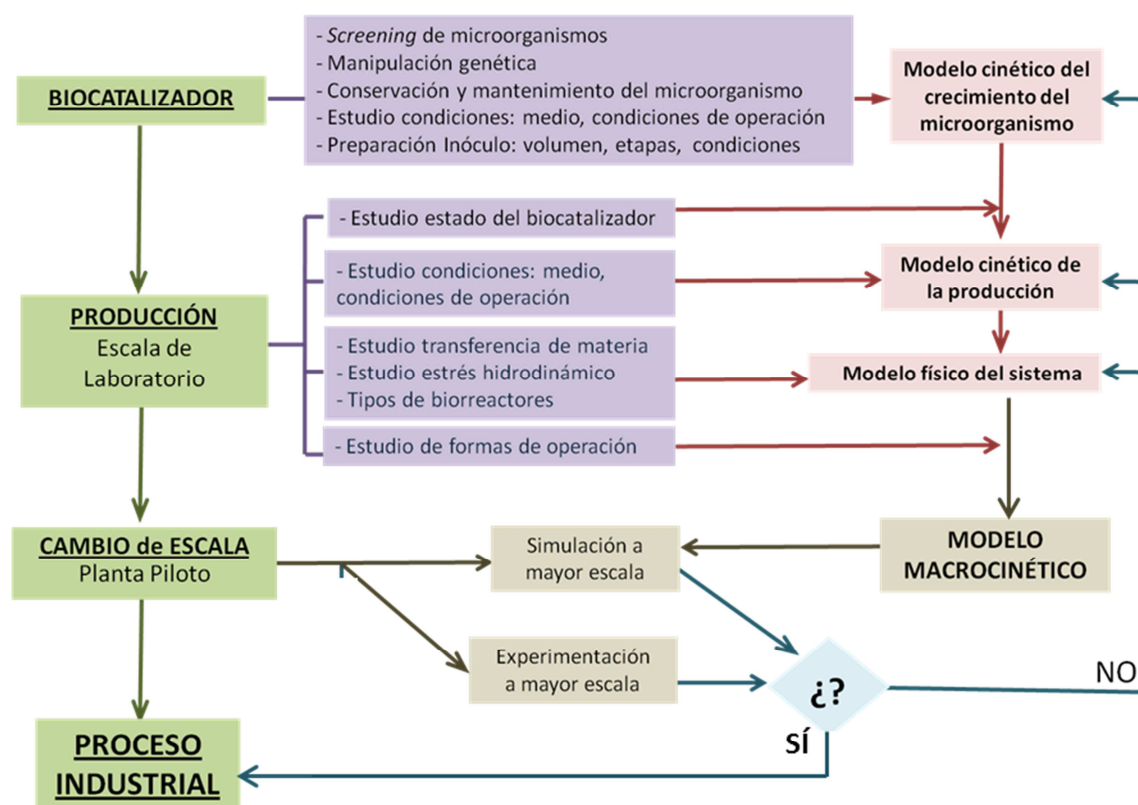


Figura 4.1 Esquema de las etapas de la metodología general para el desarrollo de bioprocesos.

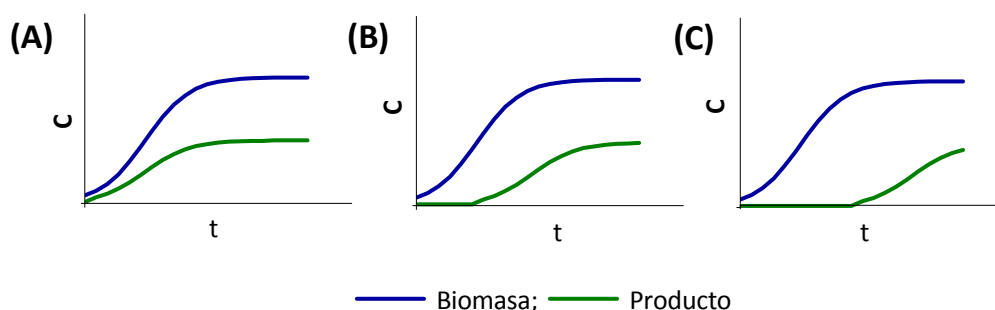


Figura 4.2 Evolución de la concentración de biomasa y la concentración de un producto (A) totalmente asociado al crecimiento, (B) parcialmente asociado al crecimiento y (C) no asociado al crecimiento.

Para alcanzar una comprensión profunda del sistema es fundamental que el dispositivo experimental empleado permita la medida y control de las variables más importantes (temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto en el caldo, velocidad de agitación, etc.). El dispositivo experimental empleado en las primeras etapas de investigación (botellas agitadas) no permite el seguimiento del proceso en el grado de detalle deseado. Por ello, los estudios incluidos en el presente capítulo se realizan en biorreactor comercial de 2 L de volumen de trabajo, cuyas características se detallan en el Capítulo 2. La geometría y sistemas de control característicos del biorreactor hacen posible su empleo para aplicar las distintas metodologías de cambio de escala con el objetivo de llegar al nivel industrial (Doran, 2013).

Fruto de la revisión bibliográfica realizada y del conocimiento del proceso adquirido en los estudios expuestos anteriormente, se resalta la importancia de la disponibilidad de oxígeno en el caldo del cultivo y del pH en el proceso. En este capítulo se profundizará en el estudio de la influencia de dichas variables en la producción de 2,3-BD para la optimización del proceso, según se enumera a continuación.

- Estudio de las condiciones hidrodinámicas en el reactor a través de la velocidad de agitación. Se va a determinar el consumo de oxígeno en cada caso y su influencia en la distribución de productos de la ruta metabólica.
- Estudio de la influencia del pH, tanto del pH inicial como del control de pH para establecer una estrategia que mejore la producción de 2,3-BD.
- Estudio de la forma de operación más eficaz para el proceso, a través de la determinación de la influencia de la concentración inicial de glicerina en *batch* y la posibilidad de desarrollar el proceso en *fed-batch*.
- Evaluar la viabilidad del proceso con glicerina cruda procedente del proceso de producción de biodiésel.

4.1 PRODUCCIÓN DE 2,3-BD EN BIORREACTOR STBR: ESTUDIO PRELIMINAR DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN

Para la profundización en la comprensión del proceso en estudio es necesario estudiar los fenómenos de transporte y la cinética de las reacciones químicas que tienen lugar durante la biotransformación. El dispositivo experimental en el que se lleva a cabo la fermentación es determinante en este estudio. La diferencia entre los cultivos a pequeña escala en botellas agitadas o matraces *Erlenmeyer* y los experimentos en biorreactor a escala de laboratorio radica

tanto en la geometría del reactor como en los sistemas empleados para su control: agitación orbital *versus* agitación mecánica; termostatación ambiental *versus* camisas calefactoras; aireación impulsada superficialmente *versus* sistemas de dispersión, etc.

A la luz de las conclusiones extraídas en el Apartado 3.1.1, en las que se pone de manifiesto la importancia de la disponibilidad de oxígeno en la distribución de productos de la ruta metabólica, se plantea un estudio de la influencia de la velocidad de agitación en biorreactor tipo tanque agitado de 2 L de volumen trabajo, como primer punto del escalado del proceso de la producción de 2,3-BD. El intervalo de velocidades de agitación empleado abarca desde 100 a 475 rpm. La planificación experimental llevada a cabo se detalla en la Tabla 4.1. Los resultados experimentales obtenidos en el análisis de la composición del caldo de cultivo (concentración de glicerina y metabolitos) así como la evolución de la concentración de biomasa y pH se adjuntan en la Tabla II.1 del Anexo II.

Tabla 4.1 Planificación experimental realizada para el estudio preliminar de la influencia de la velocidad de agitación en experimentos en discontinuo en biorreactor tipo tanque agitado de 2 L de volumen de trabajo. Condiciones: $T (^{\circ}\text{C}) = 30$; medio de cultivo 2; $C_G (\text{g/L}) = 30$; $Q_{\text{aire}} (\text{vvm}) = 1,5$; $\text{pH}_0 = 7,0$; evolución pH libre.

EXPERIMENTO	Velocidad de agitación (rpm)
B1	100
B2	175
B3	250
B4	325
B5	400
B6	475

En la Figura 4.3 se representan, de forma comparativa, la evolución de la concentración de biomasa (A), pH (B), la concentración de glicerina (C) y la concentración de 2,3-BD (D) en el intervalo de velocidades de agitación estudiado. La duración de cada experimento está determinada por el tiempo que tarda el microorganismo en consumir totalmente la fuente de carbono o bien por la variación insignificante de la concentración de glicerina en el caldo de cultivo durante un periodo de tiempo lo suficientemente largo (experimentos B5 y B6).

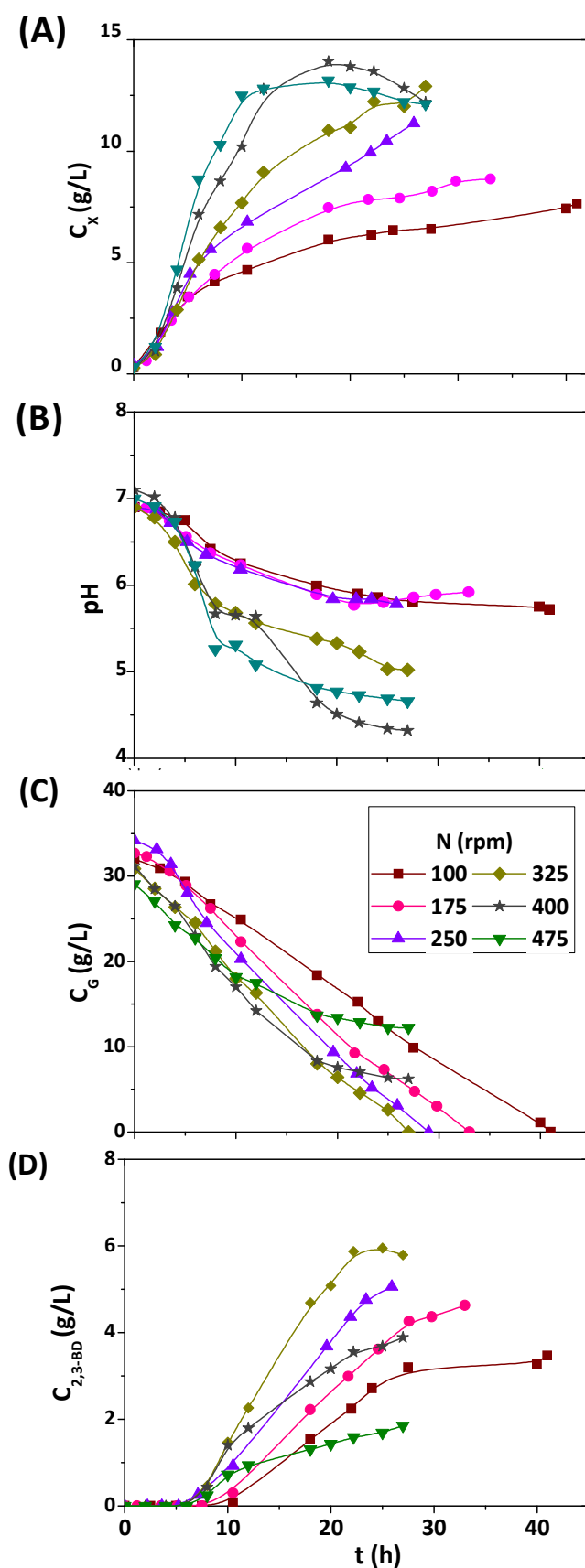


Figura 4.3 Estudio preliminar de la velocidad de agitación en biorreactor: **(A)** evolución de la concentración de biomasa, **(B)** evolución del pH, **(C)** evolución de la concentración de glicerina y **(D)** Evolución de la concentración de 2,3-BD.

Como puede observarse en la Figura 4.3 (A), el crecimiento bacteriano, en términos de velocidad de crecimiento y concentración celular máxima alcanzada, está claramente influido por las condiciones fluidodinámicas del interior del tanque, determinada por la velocidad de agitación empleada en cada caso. Al aumentar la velocidad de agitación, se observa una mayor velocidad de crecimiento bacteriano en el intervalo de velocidades de agitación estudiado. La concentración celular máxima alcanzada presenta la misma tendencia, a excepción de la curva obtenida cuando se emplea 475 rpm como velocidad de agitación, donde la concentración máxima alcanzada es ligeramente inferior a la obtenida en el experimento de 400 rpm.

A la vista de las Figuras 4.3 (C) y 4.3 (D), se puede afirmar que el metabolismo celular, en términos de consumo de sustrato y producción de 2,3-BD, también se encuentra íntimamente influido por la velocidad de agitación empleada. La variación de ambas variables es similar. En el intervalo de velocidades de agitación comprendido entre 100 y 325 rpm, se observa un incremento de la velocidad de consumo de sustrato carbonado así como de velocidad de producción de 2,3-BD con el aumento de la velocidad de agitación. En el caso del producto de interés, además se observa un incremento de la concentración máxima alcanzada al finalizar el experimento. Esta tendencia se ve claramente alterada en las velocidades de agitación más elevadas dentro del intervalo estudiado, 400 y 475 rpm, donde destaca que no se alcanza el consumo total del sustrato carbonado y se produce un estancamiento del proceso a partir de aproximadamente 20 h de fermentación.

El comportamiento anteriormente descrito puede ser explicado atendiendo a la evolución del pH en cada uno de los experimentos, tendencias recogidas en la Figura 4.3 (B). La evolución de pH correspondiente a los experimentos realizados en las tres velocidades de agitación inferiores, 100, 175 y 250 rpm, son prácticamente iguales y no descienden por debajo de 5,8. En las tres agitaciones superiores, 325, 400 y 475 rpm, se observa que la evolución de pH se desvía de las anteriores, alcanzando valores cercanos a 5,0 en el experimento de 325 rpm y en torno a 4,5 en los experimentos de 400 y 475 rpm. Este descenso drástico del pH hacia valores ácidos parece ser el responsable de la detención de la actividad metabólica de las células.

Fruto de las observaciones anteriormente expuestas, se hace visible la necesidad de plantear un estudio en profundidad sobre el papel del pH en el proceso, objeto de estudio del siguiente apartado. Para la realización del mismo, se escogió como velocidad de agitación 325 rpm.

4.2 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL pH EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE 2,3-BD EN BIORREACTOR STBR

Avalado por las conclusiones extraídas en el Apartado anterior, se planteó un estudio en profundidad de la influencia del pH en el proceso de biotransformación de glicerina en 2,3-BD. Son numerosos los trabajos publicados sobre la producción de 2,3-BD que destacan la importancia que juega el pH en el proceso, cuya influencia se impone más allá del microorganismo empleado como biocatalizador y del sustrato utilizado como fuente de carbono.

En la Figura 4.4 (A) se ha representado las reacciones metabólicas para la transformación de glicerina en piruvato, molécula central del metabolismo fermentativo de *Raoultella terrigena*. Como puede observarse, la ruta consta de cuatro reacciones en serie, que pueden tener lugar por vía oxidativa del glicerol a dihidroxiacetona o bien por fosforilación del sustrato a glicerol-3-fosfato. Cualquiera de estos dos intermedios puede ser transformado en dihidroxiacetona fosfato, que a través del intermedio fosfoenolpiruvato da lugar a una molécula de piruvato. Cabe destacar que esta ruta metabólica conlleva el consumo de la coenzima oxidada NAD^+ , generando en el proceso poder reductor, NADH .

En la Figura 4.4 (B) se ha representado la ruta fermentativa ácido-mixta encargada de transformar el piruvato en los distintos compuestos finales del metabolismo: ácido fórmico, ácido láctico, etanol, ácido acético, 2,3-BD y su precursor, acetoína. En distintas reacciones de la ruta también se desprende dióxido de carbono así como en la descomposición del ácido fórmico. La ruta metabólica descrita se encuentra presente en otras bacterias de la familia de las Enterobacterias, como las pertenecientes a los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter*, así como en la familia de las bacterias del ácido láctico (Lactobacillaceae), ambas caracterizadas por su versatilidad en lo que respecta al metabolismo fermentativo (Savakis y col., 2013). Atendiendo a la estequiometría de las reacciones de la ruta metabólica se puede determinar el rendimiento máximo teórico ($\gamma_i^{\text{MÁX}}$) para cada uno de los compuestos finales de la ruta metabólica, que corresponde con la cantidad máxima de cada metabolito que puede ser producida a partir de 1 g de glicerina, en el caso de que todo el sustrato se empleara para la síntesis de dicho compuesto. En la Tabla 4.2 se recogen los valores de esta variable para los compuestos finales de la ruta fermentativa ácido-mixta: 2,3-BD, ácido láctico, ácido acético y etanol.

La biosíntesis de 2,3-BD tiene lugar a través de tres reacciones en serie, que comienza con la condensación de dos moléculas de piruvato formando una molécula de α -acetolactato (α -AL), con la consiguiente expulsión de una molécula de dióxido de carbono. Esta reacción está catalizada la enzima α -acetolactatosintetasa (ALS), de especial importancia en el metabolismo

de síntesis de cadenas de cuatro carbonos de longitud. Sin embargo, ha sido descrito que la enzima ALS tiene baja afinidad por el piruvato, siendo necesarias condiciones de acidificación intracelular y de acumulación de piruvato para encontrarse favorecida la ruta. Diversos autores han determinado que el pH óptimo para la actividad catalítica de ALS es 6,0 (Juni, 1952; Snoep y col., 1992; Tsau y col., 1992; Blomqvist y col., 1993; Zuljan y col., 2014).

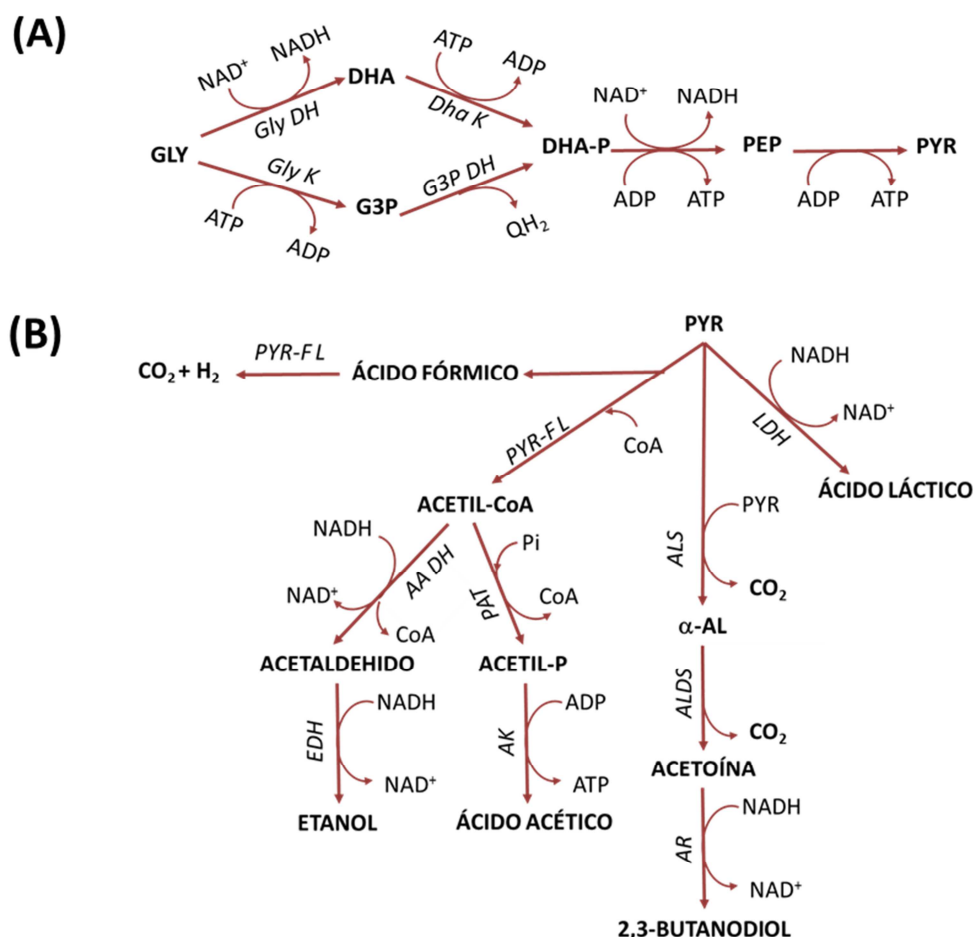


Figura 4.4 (A) Ruta metabólica del glicerol. Compuestos implicados: glicerol (GLY), dihidroxiacetona (DHA), glicero-3-fosfato (G3P), dihidroxiacetona fosfato (DHA-P), fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato (PYR). Enzimas implicadas: glicerol deshidrogenasa (Gly DH), glicerol quinasa (Gly K), dihidroxiacetona quinasa (Dha K), glicero-3-fosfato deshidrogenasa (G3P DH). **(B)** Ruta fermentativa ácido-mixta del piruvato. Compuestos implicados: piruvato (PYR), ácido fórmico, dióxido de carbono (CO_2), hidrógeno (H_2), ácido láctico, acetil coenzima A (Acetil-CoA), acetaldehído, etanol, acetilfosfato (acetil-P), ácido acético, α -acetolactato (α -AL), acetoína, 2,3-butanodiol. Enzimas implicadas: piruvato-formato liasa (PYR-F L), acetaldehído deshidrogenasa (AA DH), etanol, deshidrogenasa (E DH), fosfato acetiltransferasa (PAT), acetato quinasa (AK), α -acetolactato sintetasa (ALS), acetolactato descarboxilasa (ALDS), acetoína reductasa o butanol deshidrogenasa (AR), lactato deshidrogenasa (LDH).

Tabla 4.2 Rendimiento máximo teórico (Y_i^{MAX}) para cada uno de los metabolitos.

COMPUESTO	2,3-BD	ÁCIDO LÁCTICO	ÁCIDO ACÉTICO	ETANOL
Y_i^{MAX} (g/g)	0,489	0,978	0,652	0,500

Seguidamente, la molécula de α -acetolactato es sometida a una reacción de descarboxilación catalizada por la enzima acetolactatodescarboxilasa (ALDS). Finalmente, el producto de esta reacción, la acetoína, es reducido mediante la enzima acetoína reductasa (AR), también denominada butanodiol deshidrogenasa, para producir 2,3-BD (Blomqvist y col., 1993). Asimismo la enzima AR también puede catalizar la reacción inversa de oxidación de 2,3-BD a acetoína, de especial importancia cuando se agotan otras fuentes de carbono, pudiendo ser empleado el diol como sustrato para el crecimiento celular y como fuente para obtener energía. Sin embargo, cada una de las estas reacciones se encuentra favorecida en un intervalo de pH específico. Aunque los valores óptimos de pH para la reacción de oxidación y reducción encontrados en bibliografía varían notablemente en función del microorganismo empleado, tal y como se ha recogido en la Tabla 4.3, se puede generalizar para todos ellos que las condiciones neutras o ácidas favorecen la reacción de reducción (producción de 2,3-BD), mientras que las condiciones más básicas conducen al producto oxidado (acetoína) (Zhang y col. 2014; Yang y col., 2015).

Tabla 4.3 Valores óptimos de pH para la actividad enzimática de AR en la reacción de reducción de acetoína a 2,3-BD y la reacción de oxidación de 2,3-BD a acetoína para diferentes microorganismos (Zhang y col., 2014; Yang y col., 2015).

Cepa	pH _{óptimo} para la reducción	pH _{óptimo} para la oxidación
<i>Serratia marcescens</i>	4,5	9,0
<i>Gluconobacter oxydans</i>	7,0	9,0
<i>Lactococcus lactis</i>	5,8	10,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6,7	7,2
<i>Pyrococcus furiosus</i>	6,1	8,8
<i>Bacillus polymyxa</i>	7,0	9,0
<i>Bacillus subtilis</i>	6,5	8,5
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6,5	8,5

Además, la producción de 2,3-BD es considerada como una estrategia homeostática de la célula para contrarrestar las condiciones ácidas del medio que generan situaciones de estrés potencialmente letales, mediante el desvío de la ruta metabólica hacia la producción de 2,3-BD, debido a que las reacciones implicadas en la misma conllevan el consumo de protones así como por el carácter neutro del producto final (Celinska y Grajek, 2009; Ji y col., 2011; Vivijis y col., 2014; Wang y col., 2014; Yang y col., 2014).

La ruta metabólica de síntesis de 2,3-BD tiene lugar mediante el consumo de cofactor NADH_2 , molécula por la que también compiten las enzimas implicadas en la síntesis de ácido láctico y etanol, razón por la cual algunas investigaciones se han centrado en el empleo de microorganismos modificados genéticamente de forma dirigida, inhibiendo estas rutas para dirigir el metabolismo bacteriano hacia la producción de 2,3-BD así como en el aumento de las copias de material genético que codifican la enzima AR (Jantama y col., 2015; Lee y col., 2015; Tan y col., 2015; Yang y col., 2015a).

A nivel macroscópico, se puede afirmar que las condiciones de pH del medio de cultivo son capaces de dirigir la ruta metabólica hacia la producción a unos u otros metabolitos (Hoefnagel y col., 2002; Han y col., 2012). En general, se sabe que las condiciones alcalinas desvían la ruta metabólica hacia la formación de ácidos orgánicos, con la consecuente reducción del rendimiento a 2,3-BD. Por otro lado, bajo condiciones ácidas, la síntesis de dioles se incrementa, en detrimento de la producción de los compuestos de carácter más ácido. Todas las investigaciones coinciden en que el intervalo óptimo de pH que favorece la síntesis de 2,3-BD está en torno 5,5 y 6,5 (Blieb y col., 1998; Nakashimada y col., 1998; Zeng y col., 1990; Perego y col., 2000; Petrov y Petrova, 2009; Anvari y Motlagh, 2010; Park y col., 2013; Wong y col., 2014; Yang y col., 2015).

La información anteriormente expuesta pone de manifiesto la importancia del pH en el proceso de producción de 2,3-BD. La ausencia de estudios previos en torno al comportamiento de *Raoultella terrigena* justifica la necesidad de llevar a cabo un estudio en profundidad de dicha variable en este trabajo. Por tanto, el objeto del presente Apartado es determinar cuál es la influencia del pH en el metabolismo de la glicerina para poder desarrollar una estrategia de pH que favorezca la producción de 2,3-BD frente a otros productos de la ruta metabólica. Para alcanzar dicho objetivo, se estudiará el comportamiento del sistema cuando el pH permanece controlado así como cuando evoluciona libremente desde distintos valores iniciales. La elección del rango de pH estudiado se realizó en base a la información encontrada en bibliografía

anteriormente comentada, abarcando el intervalo desde condiciones ácidas (5,5) a pH neutro (7,0).

4.2.1 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL pH: CONDICIONES CONTROLADAS Y EVOLUCIÓN LIBRE

En este Apartado se incluye el estudio de la influencia del pH, tanto en condiciones de pH controlado a un valor fijo como evolución del pH libre, sin control. Ambos estudios se han llevado a cabo en un intervalo de pH ácidos, cuya justificación en base a la información encontrada en bibliografía se ha comentado anteriormente. En la Tabla 4.4 se incluye la planificación experimental realizada en este apartado, en relación con el estudio de la influencia del pH controlado (experimentos B7 a B10) y la influencia del pH inicial sin posterior control de esta variable (experimentos B11 a B14). El control de pH se realizó mediante la adición a demanda de ácido clorhídrico (2M) e hidróxido sódico (2 M). En la Tabla II.2 del Anexo II, se muestra la evolución de las concentraciones de sustrato y metabolitos detectados en el caldo de cultivo así como la evolución de la concentración de biomasa y pH para los experimentos realizados con control de pH y en la Tabla II.3 del Anexo II para aquellos sin control de pH.

Tabla 4.4 Planificación experimental realizada para el estudio de la influencia del pH controlado en experimentos en discontinuo en biorreactor tipo tanque agitado. Condiciones: $T (^{\circ}C) = 30$; medio de cultivo 2; $C_G (g/L) = 30$; $Q_{aire} (vvm) = 1,5$; $N (rpm) = 325$; Control de pH: HCl (2M), NaOH (2M).

EXPERIMENTO	pH	Evolución
B7	5,5	Constante
B8	6,0	
B9	6,5	
B10	7,0	
B11	5,5	Libre
B12	6,0	
B13	6,5	
B14	7,0	

Como criterio de comparación de los resultados obtenidos en diferentes condiciones, se han definido los siguientes parámetros:

- La **conversión de glicerina** (X_G) relaciona la cantidad de sustrato consumido al final del experimento con la cantidad inicial del mismo, tal y como se ha definido en la ecuación [4.1].

$$X_G = (C_G^0 - C_G^t) / C_G^0 \quad [4.1]$$

- El **rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico** ($\eta_{2,3-BD}$) muestra la relación entre el rendimiento a 2,3-BD (definido en la ecuación [3.1]) respecto al rendimiento máximo teórico, cuyo valor se muestra en la Tabla 4.2. El cálculo de este parámetro se realiza según la ecuación [4.2].

$$\eta_{2,3-BD} = Y_{2,3-BD} / Y_{2,3-BD}^{MAX} \quad [4.2]$$

- La **productividad de 2,3-butanodiol** ($P_{2,3-BD}$) relaciona la cantidad de 2,3-BD máxima producida a lo largo del experimento con el tiempo que tarda en alcanzarse, tal y como muestra la ecuación [4.3].

$$P_{2,3-BD}(g/L \cdot h) = C_{2,3-BD}^{max} / t \quad [4.3]$$

- La **selectividad del metabolito i** (S_i) se define como la concentración del compuesto i presente en el caldo de cultivo al final del experimento respecto al sumatorio de las concentraciones de todos los productos metabólicos detectados en el caldo a ese mismo tiempo, como muestra la ecuación [4.4]. Este parámetro cuantifica la proporción, en términos másicos, de cada compuesto producto del metabolismo fermentativo en relación al total de metabolitos producidos presentes al finalizar el experimento.

$$S_i(g/g) = C_i^t / \sum C_j^t \quad [4.4]$$

En la Figura 4.5 se han representado la conversión de glicerina, el rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico y la productividad de 2,3-BD en función del pH, en los experimentos realizados a pH constante y evolución libre de pH desde distintos valores iniciales. Las tendencias observadas para cada bloque experimental son contrarias. Cuando el pH se controla a valores constantes, el pH ácido favorece el metabolismo bacteriano y la producción de 2,3-BD, como se refleja en los valores de conversión, rendimiento a 2,3-BD y productividad. El mantenimiento del pH en valores cercanos a la neutralidad provoca la caída drástica de todos los parámetros estudiados. En las mejores condiciones probadas, correspondientes al control de pH en 5,5, se alcanza prácticamente la conversión total de glicerina (92%), el rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico alcanza el 28% y la productividad supera 0,20 g/(L·h).

La evolución sin control del pH desde distintos valores iniciales da lugar a la tendencia contraria a la anteriormente discutida para los experimentos con control de pH. Como puede observarse en la Figura 4.5, el mejor resultado de los tres parámetros estudiados se obtiene a pH neutro. En este caso, la conversión supera el 90%, el rendimiento a 2,3-BD es del 40% y la productividad 0,24 g/(L·h). Asimismo, cuanto más ácido es el pH inicial, menor conversión de glicerina se alcanza es menor, viéndose reflejado también en el rendimiento y productividad a 2,3-BD.

En la Figura 4.6 se ha representado la selectividad para cada uno de los metabolitos presentes en el caldo de cultivo en los experimentos realizados a pH constante (A) y aquellos con evolución libre de pH (B). Este parámetro tiene en cuenta la relación de la concentración de cada compuesto frente al total de productos producidos, como se definió en la ecuación [4.4]. Refleja, por tanto, la distribución de los productos en el caldo de fermentación cuando la concentración de 2,3-BD es máxima.

A la vista de dicha Figura, cabe destacar que en ninguno de los experimentos realizados a pH constante, el 2,3-BD es el producto principal del proceso de fermentación de la glicerina, siendo en todo el intervalo de pH estudiado, mayor la selectividad a etanol. Esta tendencia tiene que ver con las estrategias homeostáticas que la bacteria activa en las condiciones menos favorables para la viabilidad celular. En las condiciones más ácidas los productos principales son etanol y 2,3-BD, siendo prácticamente despreciables los ácidos láctico y acético. En estas condiciones se favorece la producción de los compuestos de carácter menos ácido para evitar una acidificación mayor del medio, que conllevaría la muerte celular, tal y como han indicado algunos autores en bibliografía (Blieb y col., 1998; Petrov y Petrova, 2009; Petrov y Petrova, 2010).

Cuando el pH no está controlado, el 2,3-BD es el producto mayoritario detectado en el caldo de cultivo en el intervalo de pH estudiado, alcanzando el mayor valor cuando el pH inicial es 7,0. Respecto al resto de metabolitos, la selectividad a etanol, segundo producto mayoritario, presenta un máximo cuando el pH inicial del medio de cultivo es 6,5. Esta misma tendencia se observa también para el ácido láctico, aunque como producto minoritario. En el caso del ácido acético y la acetoína, la producción de estos compuestos también se encuentra favorecida cuanto más ácido es el valor de pH inicial.

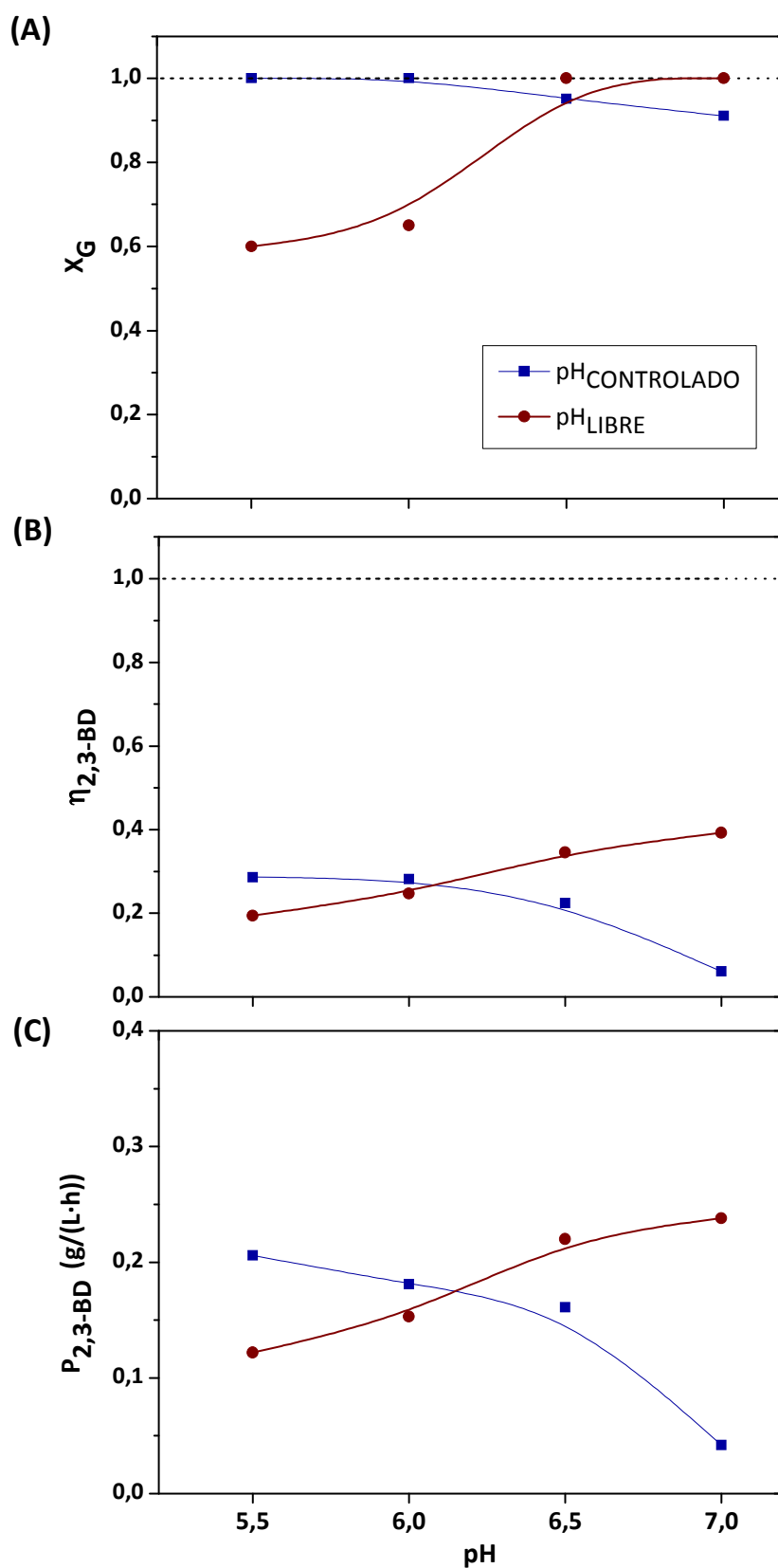


Figura 4.5 Resultados comparativos de **(A)** conversión de glicerina, **(B)** rendimiento 2,3-BD respecto al máximo teórico y **(C)** productividad de 2,3-BD al finalizar el experimento, correspondiente a los experimentos B7 a B10, donde el pH se ha mantenido controlado a un valor constante, y a los experimentos B11 a B14, donde el pH ha seguido una evolución libre.

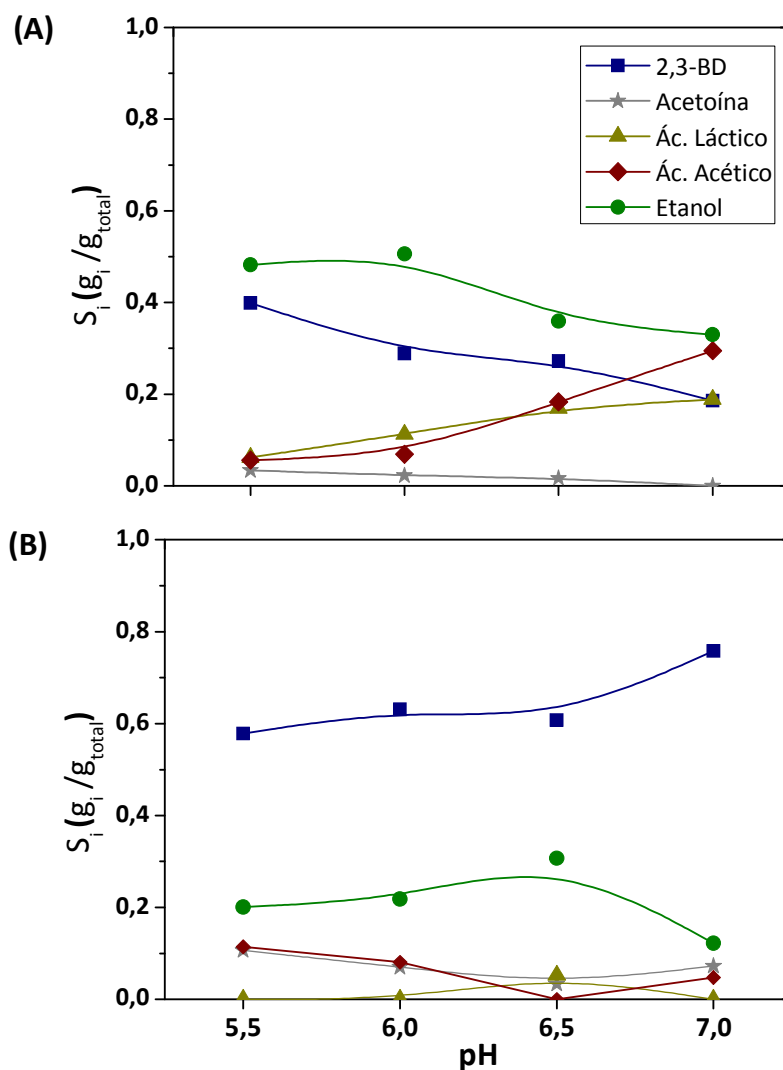


Figura 4.6 Influencia del pH controlado del medio de cultivo en la selectividad de cada uno de los metabolitos de la ruta presentes en el caldo cuando la concentración de 2,3-BD es máxima **(A)** en los experimentos con control de pH (experimentos B7 a B10) y **(B)** en los experimentos con evolución libre de pH (experimentos B11 a B14).

A la vista de los resultados comentados anteriormente, se concluye que la producción de 2,3-BD se mejora bajo condiciones de pH no controladas desde pH neutro. Si bien se ha comprobado que son las condiciones ácidas las que favorecen la producción de este metabolito.

Por último, en la Figura 4.7 se muestra la evolución del pH frente a la concentración de 2,3-BD en los experimentos sin control de pH (B11 a B14). En los experimentos con pH inicial más bajo, 5,5 y 6,0, el pH baja drásticamente a lo largo del experimento, provocando inevitablemente la detención del proceso. Sin embargo, en el experimento correspondiente a pH inicial neutro la bajada de pH no alcanza valores tan ácidos (el pH final es 5,1), debido al mayor valor inicial de partida. Asimismo es destacable que en todos los casos la producción de 2,3-BD

no comienza hasta que el pH no adquiere un valor cercano a 6. A la vista de estos resultados se va a desarrollar una estrategia de pH para mejorar la producción de 2,3-BD combinando las conclusiones extraídas de las condiciones de pH estudiadas en este Apartado.

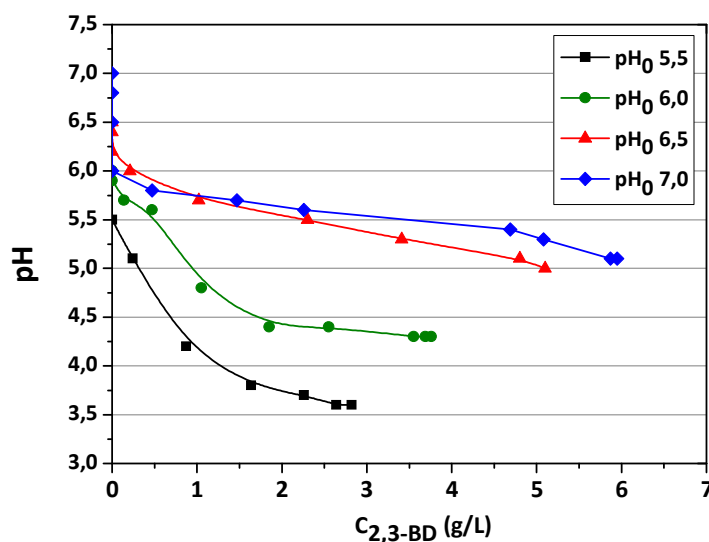


Figura 4.7 Comparación de la evolución del pH frente a la concentración de 2,3-BD en los experimentos B11 a B14.

4.2.2 DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE pH PARA LA MEJORA DE LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BD

A la luz de las tendencias observadas en los apartados anteriores, se va a plantear una estrategia de pH para mejorar la producción de 2,3-BD basada en la combinación de las mejores condiciones determinadas para los estudios realizados de control de pH así como sobre el pH inicial. Con anterioridad otros autores han diseñado estrategias de control de pH en varias etapas para maximizar la producción de 2,3-BD en base a las observaciones previas realizadas para el microorganismo y sustrato empleado en cada caso, con exitosos resultados (Petrov y Petrova, 2009; Zhang y col., 2014; Yang y col., 2015b). La estrategia propuesta en este trabajo parte como intento de mejora de los resultados obtenidos en el experimento B14, correspondiente a evolución libre de pH desde pH inicial 7,0, donde a pesar de alcanzar prácticamente el consumo total de la fuente de carbono, a lo largo del experimento se registra una bajada de pH 7 hasta 5,1 (ver Figura 4.7). Sostenido en los resultados obtenidos en la presente investigación, se propone desarrollar el siguiente perfil de pH: comienzo en pH neutro y bajada libre de pH hasta alcanzar 5,5, valor al que se controlará el pH hasta el fin del experimento. En la Tabla 4.5 se incluye la planificación experimental realizada a tal efecto. En la

Tabla II.4 del Anexo II se adjunta la evolución de las concentraciones de sustrato y metabolitos detectados en el caldo de cultivo así como la evolución de la concentración de biomasa y pH.

Tabla 4.5 Planificación experimental para el desarrollo de una estrategia de pH para la mejora de la producción de 2,3-BD en discontinuo en biorreactor tipo tanque agitado. Condiciones: $T (^{\circ}\text{C}) = 30$; medio de cultivo 2; $C_G (\text{g/L}) = 30$; $Q_{\text{aire}} (\text{vvm}) = 1,5$; $N (\text{rpm}) = 325$; Control de pH: HCl (2M), NaOH (2M).

EXPERIMENTO	pH ₀	pH _{control}
B15	7,0	5,5

La Tabla 4.6 muestra los valores de los parámetros empleados para caracterizar el proceso de producción de 2,3-BD. Se han incluido los resultados obtenidos en el experimento B15, correspondiente al experimento con el perfil de pH definido, así como los mejores resultados obtenidos en el estudio de la influencia del pH controlado y el pH inicial, correspondientes al experimento B14, caracterizado por la evolución libre de pH empezando desde un valor neutro. Mediante la estrategia de pH propuesta se consigue una mejora del proceso en términos de conversión de glicerina, rendimiento de glicerina a 2,3-BD y productividad de 2,3-BD. Se ha conseguido el consumo total de glicerina, lo que implica que mediante el perfil de pH mantenido se ha conseguido evitar la inhibición del proceso por las condiciones excesivamente ácidas del medio. Cabe resaltar que el parámetro que ha sido mejorado más significativamente es la productividad, aumentando de 0,24 a 0,32 g/(L·h), correspondiente a una mejora en un 33%.

Tabla 4.6 Resultados de conversión de glicerina, rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico, productividad de 2,3-BD y selectividad a 2,3-BD en los experimentos B15 y B14.

Parámetro	EXPERIMENTO	
	B15	B14
pH ₀	7,0	7,0
pH _{final}	5,5	5,1
C _{2,3-BD} (g/L)	6,54	5,95
X _G	1,00	0,92
η _{2,3-BD}	0,45	0,39
P _{2,3-BD} [g/(L·h)]	0,32	0,24

En la Figura 4.8 se muestra la comparación de los valores de selectividad para cada metabolito presente en el caldo de fermentación al finalizar el experimento de estrategia de pH y el de evolución libre desde pH neutro. Como puede observarse, con la estrategia de pH se activa el metabolismo bacteriano, lo que se refleja en un aumento de la concentración de los subproductos, que afecta negativamente a la selectividad de la transformación a 2,3-BD. Sin embargo, la en términos de conversión, rendimiento y productividad justifican que se considere que la estrategia de pH propuesta significa una mejora del proceso y por tanto será empleada en los estudios posteriores del mismo.

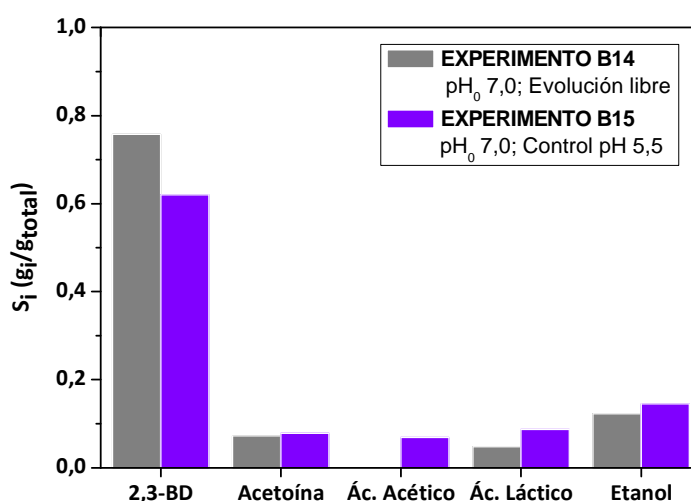


Figura 4.8 Comparación de la selectividad de los metabolitos presentes en el caldo de cultivo en los experimentos B14 y B15.

4.3 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES HIDRODINÁMICAS EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE 2,3-BD EN BIORREACTOR STBR

Los bioprocesos constituyen complejos sistemas heterogéneos de tipo trifásico, caracterizados por la existencia de una fase gaseosa constituida por el gas de entrada al fermentador y los gases generados durante el proceso, una fase líquida compuesta por el medio de cultivo y una fase sólida formada por el microorganismo. De tal forma que involucran de forma simultánea fenómenos de transporte y reacciones bioquímicas en las que participan un elevado número de especies químicas (García-Ochoa y Gómez, 2009).

El papel del oxígeno es determinante en el desarrollo de numerosos bioprocesos, actuando como nutriente clave en el crecimiento y mantenimiento celular, pudiendo incluso dirigir el transcurso de determinadas rutas metabólicas, entre las que se incluyen las de síntesis de metabolitos secundarios, que a menudo constituyen el producto de interés de la

fermentación. La velocidad macroscópica a la que el proceso tiene lugar está controlada por la velocidad del fenómeno microscópico más lento, que en el caso de muchas biotransformaciones está marcado por la velocidad de transferencia de oxígeno de la fase gas a la fase líquida (OTR: *Oxygen Transfer Rate*), debido a su baja solubilidad en ésta, o bien por el consumo de oxígeno por el microorganismo (OUR: *Oxygen Uptake Rate*). Este hecho resalta la importancia del estudio de OTR Y OUR, fenómenos que deben de ser considerados tanto en el diseño del reactor como en el posterior estudio de escalado del proceso (García-Ochoa y col., 2010).

A pesar de que el 2,3-BD es producto del metabolismo fermentativo anaeróbico, diversos autores han puesto de manifiesto que el oxígeno es una de las variables más influyentes en el rendimiento del proceso así como determinante en la distribución de los metabolitos de la ruta metabólica (Beronio y Tsao, 1993; Nakashimada y col., 1998; Faveri y col., 2003; Chen y col., 2009; Ji y col., 2009; Li y col., 2010; Petrov y Petrova, 2010; Wang y col., 2011; Yen y col. 2014; Yang y col. 2015b). Todas las investigaciones apuntan a que la producción óptima se alcanza en condiciones limitadas de transferencia de oxígeno, también denominadas de microaireación, caracterizadas porque la demanda microbiana de oxígeno (OUR) es mayor que la cantidad de oxígeno transferido al medio (OTR). En estas condiciones, las rutas respiratoria y fermentativa son activadas simultáneamente, debido al carácter anaerobio facultativo del metabolismo de los biocatalizadores empleados en dichas investigaciones.

Atendiendo a la ruta metabólica implicada en la biosíntesis de 2,3-BD, se puede extraer también la importancia de la disponibilidad de oxígeno. Por un lado, la actividad de la enzima ALS, que cataliza la síntesis de la molécula precursora α -acetolactato en la célula (ver Figura 4.4.B), es muy sensible a la concentración de oxígeno disuelto en el caldo, presentando mayor actividad en condiciones limitantes de oxígeno (Blomqvist y col., 1993; Zuljan y col., 2014). Por otro lado, la posibilidad de que la síntesis de 2,3-BD tenga lugar vía oxidación química de la molécula de α -acetolactato para producir el metabolito intermedio diacetil, implica el consumo directo de una molécula de oxígeno. Por último, una mayor disponibilidad de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo favorece el crecimiento microbiano y, de forma indirecta, puede implicar tanto la mejora de la producción de 2,3-BD por el aumento de células disponibles para el proceso (Voloch y col., 1985; Blomqvist y col., 1993; Celinska y Grajek, 2009; Ji y col., 2011). Por todo ello, es fundamental evaluar la influencia de las condiciones hidrodinámicas en el transporte y consumo de oxígeno que optimicen el proceso producción de 2,3-BD empleando células en crecimiento como biocatalizador.

Debido a que la disponibilidad de oxígeno en un biorreactor está determinada por las condiciones fluidodinámicas en el interior del mismo, en el presente Apartado se va a llevar a cabo un estudio de la influencia de las condiciones hidrodinámicas en el proceso de producción de 2,3-BD empleando como fermentador un biorreactor comercial de 2 L de volumen de trabajo tipo tanque agitado (STBR). Además de a geometría del reactor, las variables de operación del sistema que influyen en las condiciones hidrodinámicas son la velocidad de agitación, el caudal de la corriente de gas a la entrada del fermentador y la composición de éste. Teniendo en cuenta que la influencia de la velocidad de agitación en las condiciones fluidodinámicas es mucho mayor que la del caudal de gas (Garcia-Ochoa y Gomez, 2004), y que la presente investigación se centra en el análisis del proceso con vistas a su implantación a escala industrial posterior, quedan fuera del alcance de este estudio la influencia del caudal de la corriente de entrada así como el planteamiento de otras alternativas posibles enfocadas a la composición del gas de entrada que no sea el empleo de aire, como por ejemplo, el empleo de aire enriquecido o de oxígeno puro que, evidentemente, encarecerían el proceso. Para abarcar el objeto de este Epígrafe, se va a estudiar la influencia de la velocidad de agitación en la producción de 2,3-BD, relacionando los resultados obtenidos con el fenómeno de transferencia y consumo de oxígeno en cada caso.

4.3.1 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

Las condiciones fluidodinámicas determinan la disponibilidad de oxígeno en el interior del tanque agitado. Debido a la baja solubilidad de este nutriente en la fase acuosa constituida por el caldo de cultivo, es necesaria la alimentación continua de oxígeno mediante la entrada de una corriente gaseosa. El balance de materia en el reactor correspondiente a una especie que está siendo alimentada de forma continua, puede expresarse según la expresión [4.5], donde el término OTR corresponde con la velocidad de transporte de oxígeno y el término OUR corresponde con la velocidad de consumo de oxígeno microbiano.

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} (mol_{O_2}/L \cdot s) = OTR - OUR \quad [4.5]$$

La complejidad del sistema trisfásico hace que la transferencia de una molécula de oxígeno desde una burbuja de gas a la célula (fase sólida) a través del medio de cultivo (fase líquida) pueda ser descrita como una batería de resistencias en serie, relacionadas con el transporte en el seno de cada una de las fases implicadas (gas-líquido-sólido) así como la difusión de las moléculas en cada una de las interfases (gas-líquido y líquido-sólido). Sin embargo, la resistencia de la capa líquida que rodea las burbujas de gas suelen controlar la

velocidad global de transferencia de materia y el problema del transporte de oxígeno se reduce así a la transferencia de materia en la interfase gas-líquido (Van't Riet, 1983; Blanch y Clark, 1997). Por tanto, el término OTR se expresa habitualmente según la expresión [4.6], dependiendo del coeficiente volumétrico de transferencia de materia y del gradiente entre la concentración del oxígeno en la interfase y la concentración en el seno del líquido.

$$OTR(\text{mol}_{O_2}/L \cdot s) = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad [4.6]$$

Donde $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de materia, $C_{O_2}^*$ es la concentración de saturación de oxígeno disuelto en el líquido y C_{O_2} es la concentración de oxígeno disuelto en cada momento.

En cultivos discontinuos, la velocidad global de consumo de oxígeno así como la velocidad específica no permanecen constantes a lo largo del crecimiento celular debido a que la concentración de células aumenta durante el proceso y a los cambios fisiológicos asociados a cada una de las diferentes fases de crecimiento microbiano (García-Ochoa y col., 2000 y 2010). El consumo de oxígeno es considerado una de las variables fundamentales que proporciona importante información sobre el estado metabólico de las células del cultivo, la actividad y viabilidad celular así como puede ser utilizado para cuantificar estrés celular frente a las diversas condiciones hidrodinámicas (García-Ochoa y col., 2015).

En el presente Apartado se va a estudiar la influencia de las condiciones hidrodinámicas en el transporte de oxígeno durante el proceso y su relación con la producción de 2,3-BD y la distribución del resto de productos de la ruta metabólica. Para lograrlo, se ha definido la siguiente metodología de trabajo:

- Obtención de los valores experimentales de concentración de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo (C_{O_2}) a lo largo de cada experimento a partir de la medida del porcentaje de oxígeno que proporciona el electrodo de oxígeno.
- Estimación teórica del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$) para cada una de las condiciones hidrodinámicas estudiadas, aplicando un método predictivo para tanques agitados aireados (García-Ochoa y Gómez, 2004).
- Determinación de la velocidad de transporte de oxígeno (OTR), aplicando la ecuación [4.6].

En la Tabla 4.7 se incluye la planificación experimental realizada en este apartado, abarcando diferentes velocidades de agitación durante el proceso, comprendidas entre 100 y

625 rpm. Durante el desarrollo de cada experimento se ha registrado en línea la temperatura, el oxígeno disuelto en el caldo de cultivo, la composición de la corriente de gas de salida del fermentador, así como la medida y el control de pH. A su vez, se han extraído muestras periódicas del caldo de cultivo para proceder a la medida de la concentración de biomasa y de los metabolitos presentes en el mismo. En las Tablas II.5 y II.6 del Anexo II se recogen los resultados obtenidos para en este bloque experimental.

Tabla 4.7 Planificación experimental realizada para el estudio de la influencia de la velocidad de agitación en experimentos en discontinuo en biorreactor tipo tanque agitado. Condiciones: $T (^{\circ}\text{C}) = 30$; medio de cultivo 2; $C_G (\text{g/L}) = 30$; $Q_{\text{aire}} (\text{vvm}) = 1,5$; $\text{pH}_0 = 7,0$; Evolución libre de pH y posterior control a pH 5,5; Control de pH: HCl (2M), NaOH (2M).

EXPERIMENTO	N
	(rpm)
N1	100
N2	175
N3	250
N4	325
N5	400
N6	475
N7	550
N8	625

Para el cálculo de OTR es necesario conocer el valor del coeficiente volumétrico de transporte. En la presente Tesis Doctoral se ha realizado una predicción teórica de $k_L a$ determinando el coeficiente de transporte, k_L y del área interfacial específica, a , para lo que se ha empleado el modelo predictivo, basado en leyes y ecuaciones fundamentales, desarrollado en trabajos previos (Garcia-Ochoa y Gomez 2004), y aplicado con éxito a diferentes sistemas (Gomez y col., 2006; Santos y col., 2006; Garcia-Ochoa y Gomez, 2009; Escobar, 2013; Martinez, 2013; Garcia-Ochoa y col., 2015; Escobar y col., 2016). La estimación de $k_L a$ se ha realizado siguiendo el procedimiento detallado en el Apartado 2.5.1 del Capítulo 2 *Parte experimental* de la presente Memoria. Las propiedades físicas del sistema, los parámetros geométricos del biorreactor y las condiciones de operación empleadas están resumidas en la Tabla 2.11 del citado apartado. En la Figura 4.9 se ha representado la influencia de la velocidad de agitación en el coeficiente de transferencia de materia. En dicha Figura se puede observar que el coeficiente volumétrico de transferencia de materia aumenta al incrementarse la velocidad de agitación,

esto se traduce en un aumento de la velocidad de transporte de oxígeno. A partir de los datos estimados se puede llegar a la expresión [4.7], que relaciona el coeficiente de transferencia con la velocidad de agitación del biorreactor.

$$k_L \cdot a \text{ (s}^{-1}\text{)} = 5,23 \cdot 10^{-5} \cdot N^{2,5} \text{ (rpm)} \quad [4.7]$$

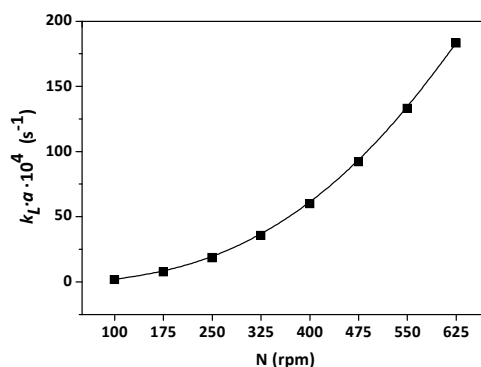


Figura 4.9 Influencia de la velocidad de agitación en el reactor tipo tanque agitado empleado en el coeficiente volumétrico de transferencia de materia (García-Ochoa y Gómez, 2009).

La importancia de determinar esta expresión radica en las etapas posteriores requeridas para la implantación del proceso a escala industrial, donde el fenómeno de transferencia de materia es uno de los decisivos en el diseño de los bioprocesos, en las que a menudo el criterio de $k_L \cdot a$ constante es impuesto para llevar a cabo el escalado del mismo (García-Ochoa y Gómez, 2009).

Para la profundización en la influencia de la transferencia de oxígeno en el proceso es necesaria la representación de la evolución de la concentración de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo medido a lo largo de cada uno de los experimentos, así como del crecimiento bacteriano, mostrados en la Figura 4.10. Como puede observarse, la concentración de oxígeno disuelto disminuye rápidamente en las primeras horas de experimentación en todos los casos, si bien la disminución de la concentración de oxígeno es más lenta cuanto mayor es la agitación debido a que el aporte de oxígeno también lo es. Para las agitaciones comprendidas entre 100 y 400 rpm, el oxígeno se mantiene en cero durante prácticamente toda la fermentación. Este hecho indica que, en estas condiciones de operación, la fermentación se está llevando a cabo en su mayor parte en una situación de limitación de oxígeno. Para las agitaciones superiores estudiadas, 550 y 625 rpm, el intervalo en el que la concentración de oxígeno se mantiene en cero es cada vez más reducido, a medida que se emplea una velocidad de agitación superior. El incremento de la velocidad de agitación desde 100 a 550 rpm favorece el crecimiento celular, observándose un crecimiento más rápido y una mayor concentración de biomasa alcanzada al

finalizar el experimento. Si bien es destacable que la curva de crecimiento obtenida para la velocidad de agitación de 625 rpm se solapa completamente con la de la velocidad de agitación inferior, 550 rpm. Este hecho, unido a la tendencia de la concentración de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo anteriormente analizada muestra que en estas condiciones el crecimiento bacteriano no se encuentra limitado por la disponibilidad de dicho sustrato.

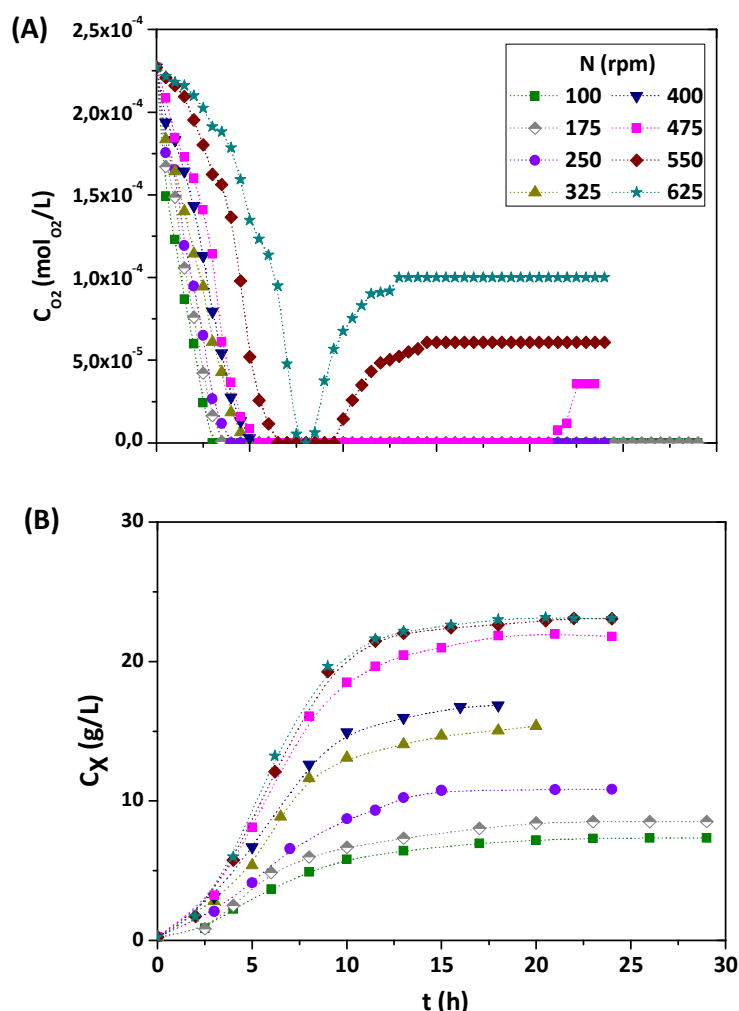


Figura 4.10 Evolución de **(A)** la concentración de oxígeno disuelto en el caldo y **(B)** la concentración de biomasa a lo largo de cada uno de los experimentos realizados a diferentes velocidades de agitación, correspondientes a los experimentos N1 a N8.

Con el fin de conocer la influencia que ejercen sobre el crecimiento las diferentes condiciones de operación utilizadas en el cultivo del microorganismo, es necesario ajustar un modelo cinético a los datos experimentales. Debido a que el crecimiento celular es un fenómeno complejo y su entendimiento en profundidad queda fuera del alcance de esta Tesis, se ha elegido un modelo sencillo de tipo no estructurado y no segregado, que considera un comportamiento celular promedio que responde a la tendencia macroscópica observada y al

microorganismo como un componente más del medio de cultivo (Garcia-Ochoa y Santos, 1994). La ecuación elegida para el desarrollo del modelo cinético del crecimiento microbiano es la denominada ecuación logística, propuesta por Pearl y Reed (1920), mostrada en la ecuación [4.8].

$$\frac{dC_X}{dt} [g/(L \cdot h)] = \mu \cdot C_X \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^{MAX}}\right) \quad [4.8]$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento y C_X^{max} es la concentración máxima de biomasa alcanzada., siendo éstos los parámetros cinéticos del modelo planteado.

Integrando la ecuación [4.8] imponiendo las siguientes condiciones límite,

$$t = 0 \therefore C_X = C_X^0 \quad [4.9]$$

se obtiene la ecuación logística antes citada:

$$C_X(g/L) = \frac{C_X^0 \cdot \exp(\mu \cdot t)}{1 - \left[\left(\frac{C_X^0}{C_X^{MAX}}\right) \cdot (1 - \exp(\mu \cdot t))\right]} \quad [4.10]$$

En la Tabla 4.8 se muestran los resultados obtenidos para el ajuste de la ecuación logística a los datos experimentales de concentración de biomasa en cada uno de los experimentos. Para realizar el ajuste, el parámetro de concentración inicial de biomasa se fijó en todos los casos, cuyo valor es conocido.

Tabla 4.8 Valores de los parámetros cinéticos calculados por ajuste del modelo cinético de crecimiento para los experimentos N1 a N8.

EXPERIMENTO	C_X^0	μ	C_X^{max}
	(g/L)	(h ⁻¹)	(g/L)
N1	0,3	0,503 ± 0,017	7,11 ± 0,12
N2	0,3	0,557 ± 0,026	8,16 ± 0,19
N3	0,3	0,576 ± 0,024	10,45 ± 0,24
N4	0,3	0,645 ± 0,016	13,30 ± 0,23
N5	0,3	0,687 ± 0,027	16,29 ± 0,38
N6	0,3	0,698 ± 0,027	21,02 ± 0,38
N7	0,3	0,718 ± 0,017	22,51 ± 0,25
N8	0,3	0,724 ± 0,019	22,01 ± 0,45

A través del análisis de la influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR, velocidad de agitación, caudal) en la velocidad de crecimiento celular se puede determinar el efecto que ejerce la hidrodinámica del biorreactor en el desarrollo de cualquier bioproceso. Cuando a velocidad de agitación no es suficiente para alcanzar el grado de mezcla y transferencia de materia requeridas, los sustratos no son distribuidos homogéneamente en el reactor, incluido el oxígeno si el proceso transcurre de forma aerobia. En este caso, las velocidades de crecimiento y de producción pueden estar afectadas por la hidrodinámica del sistema debido a las condiciones limitantes de oxígeno porque la demanda de OUR es mayor que OTR. Si la velocidad de agitación es suficiente para alcanzar unas condiciones óptimas de mezcla y transporte de materia, la velocidad global del proceso estará controlada por el metabolismo celular. Asimismo pueden existir condiciones hidrodinámicas demasiado agresivas para el microorganismo, que le expongan a situaciones de estrés hidrodinámico y oxidativo que afectan al metabolismo celular y, por tanto, disminuyen la velocidad global del proceso (García-Ochoa y col., 2013). En la Figura 4.11 aparecen representadas las tres situaciones anteriormente descritas,

- la zona (a), donde la limitación al transporte controla la velocidad del proceso,
- la zona (b), donde no existen limitaciones al transporte,
- y la zona (c), donde el proceso se ve afectado por fenómenos de estrés que determinan el comportamiento celular.

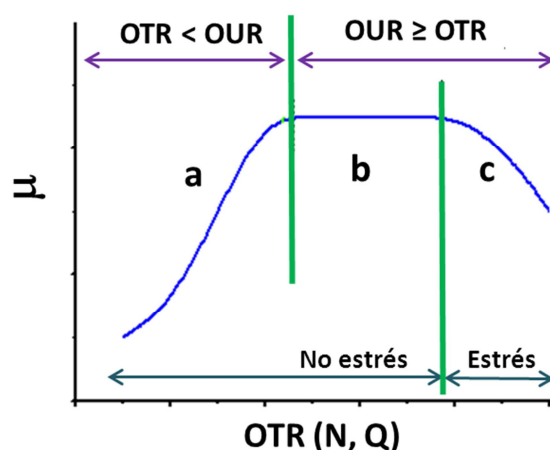


Figura 4.11 Variación teórica de la velocidad específica de crecimiento con OTR (adaptado de García-Ochoa y col., 2013).

En la Figura 4.12 se muestra la influencia de las condiciones hidrodinámicas, expresada en función del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, en los parámetros del

modelo cinético planteado para el crecimiento microbiano: la velocidad específica de crecimiento (A) y la concentración máxima de biomasa alcanzada (B). En ambas representaciones puede observarse la tendencia teórica expuesta anteriormente. Las condiciones hidrodinámicas en la zona (a), donde la transferencia de aporte de oxígeno es menor que la demanda, afectan notablemente al valor de ambos parámetros. De tal forma que cuanto mayor es el coeficiente volumétrico de transporte de materia, mayor es la velocidad específica de crecimiento bacteriano así como la concentración máxima de biomasa alcanzada. En la zona (b), correspondiente a las agitaciones 550 y 625 rpm, donde el consumo de oxígeno está determinado por la demanda de oxígeno del microorganismo y no por la cantidad del mismo transferida al caldo, el valor de los parámetros alcanza una plataforma, alcanzando $0,72 \text{ h}^{-1}$ el valor de la velocidad específica y $22,5 \text{ g/L}$ la concentración máxima de biomasa alcanzada en esta región. Cabe destacar que en las condiciones hidrodinámicas estudiadas no se observa ninguna zona de disminución de los parámetros cinéticos como consecuencia de fenómenos de estrés, que correspondería a la zona (c) de la Figura 4.11. Presumiblemente, este fenómeno tendría lugar cuando la velocidad de agitación empleada fuera lo suficientemente elevada para producir los efectos de estrés anteriormente mencionados. Sin embargo, esto queda fuera del objeto de este Capítulo, que se centra en el estudio de la influencia de las condiciones hidrodinámicas que maximicen la producción de 2,3-BD.

Para evaluar la influencia de las condiciones hidrodinámicas en la producción de 2,3-BD así como en la distribución del resto de productos metabólicos, en la Figura 4.12 (C) se ha representado el rendimiento de los productos principales de la fermentación (butanodiol, ácido láctico y etanol) y el producto principal del metabolismo de respiración (dióxido de carbono). Se han excluido del análisis tanto el ácido acético, por detectarse en muy bajas concentraciones en el caldo de cultivo, como la acetoína, precursor del 2,3-BD en la ruta metabólica, cuya producción se activa en las últimas horas de experimentación como estrategia celular de reserva de carbono ante el inminente agotamiento de la glicerina, la fuente de carbono disponible hasta ese momento. El cálculo de cada uno de los rendimientos se ha realizado con la concentración máxima detectada, que únicamente se corresponde con la registrada al final de cada experimento en el caso del 2,3 BD y el dióxido de carbono. La evolución del ácido láctico y el etanol presenta un máximo a lo largo de cada experimento y una posterior caída e incluso desaparición total por reutilización de estos compuestos por la bacteria como fuente de carbono, como estrategia celular para eliminar dichos compuestos citotóxicos del medio. Por tanto, el rendimiento para estos compuestos es calculado con la concentración máxima detectada en cada uno de sus valores máximos.

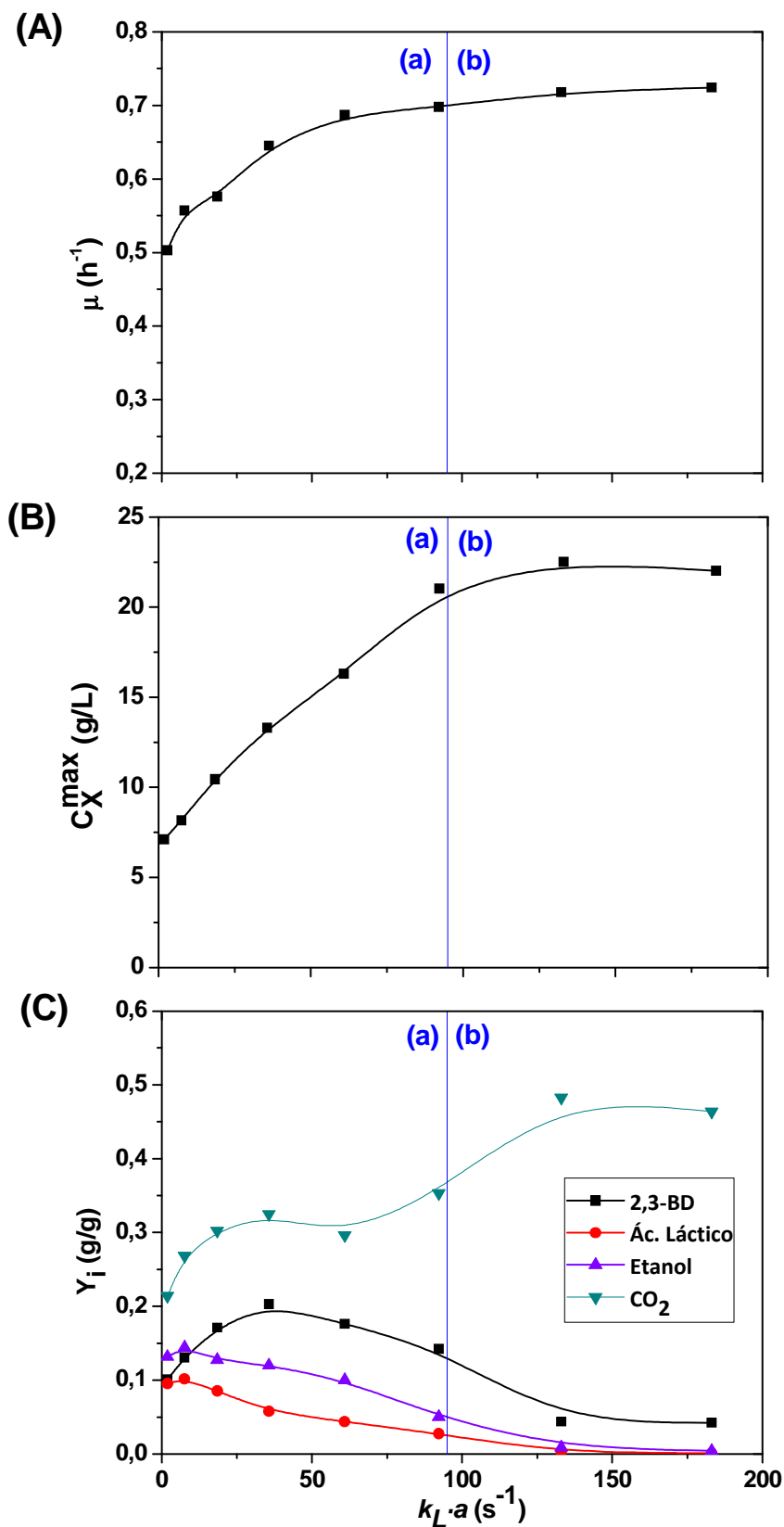


Figura 4.12 Influencia de las condiciones de transporte en (A) la velocidad específica de crecimiento, (B) la concentración de biomasa máxima alcanzada y (C) el rendimiento de los principales productos generados durante la fermentación.

Como puede observarse en la citada Figura, la distribución de productos está claramente determinada por las condiciones hidrodinámicas del biorreactor. En la región donde se registran limitaciones al transporte de oxígeno, la zona (a), es donde se generan los productos típicos de la fermentación. Mientras que los rendimientos de ácido láctico y etanol son mayores en las condiciones de menor aporte de oxígeno, el rendimiento de 2,3-BD presenta un máximo cuando el coeficiente volumétrico de transferencia de materia permanece en $3,57 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, correspondiente a la velocidad de agitación 325 rpm.

A partir de este punto, el rendimiento de dichos productos disminuye drásticamente, como consecuencia de la desviación del metabolismo bacteriano hacia la respiración, siendo mucho más acusada esta tendencia en la zona (b), donde la producción de dióxido de carbono se dispara y el único producto de fermentación detectado es 2,3-BD en cantidades mínimas, presentando una tendencia decreciente.

A partir de los resultados expuestos en el presente Epígrafe se puede concluir que la producción de 2,3-BD se encuentra favorecida en condiciones de microaerobiosis, entendiendo por éstas, aquellas condiciones donde el aporte de oxígeno es inferior a la demanda celular, permaneciendo la concentración de oxígeno disuelto durante toda la producción en cero.

4.3.2 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL CONSUMO DE OXÍGENO

La evolución del consumo de oxígeno durante el crecimiento de un cultivo celular es un indicador de la actividad y las características fisiológicas del microorganismo, por lo que numerosos autores han considerado que en la medida y control de esta variable se encuentra la clave para la optimización de algunos bioprocesos (Zeng y col., 1990b; Ensari y Lim, 2003; Rowe y col., 2003; Palomares y col., 2004; US 08828707; Garcia-Ochoa y col., 2015). Como se ha podido comprobar en el Apartado anterior, el transporte de oxígeno es la etapa controlante del proceso de crecimiento, al menos para agitaciones inferiores a 475 rpm. Este hecho justifica la necesidad de evaluar la influencia del consumo de oxígeno en el proceso de producción de 2,3-BD, que será llevado a cabo en el presente apartado.

A partir del balance de materia de oxígeno en el biorreactor, mostrado en la ecuación [4.5], y conocidos los términos de OTR y la variación de la concentración de oxígeno con el tiempo, se puede proceder de forma directa al cálculo de OUR en cada momento de la experimentación. En la Figura 4.13 se ha representado la influencia de la velocidad de agitación en la velocidad de consumo de oxígeno para cada uno de los experimentos que constituyen la planificación experimental mostrada en la Tabla 4.7, correspondiente al intervalo de velocidad

de agitación estudiado, comprendido entre 100 y 625 rpm. Como se puede apreciar en la citada Figura, dependiendo de la velocidad de agitación, la evolución de OUR es distinta, presentando dos comportamientos, que se corresponden con los observados en el crecimiento.

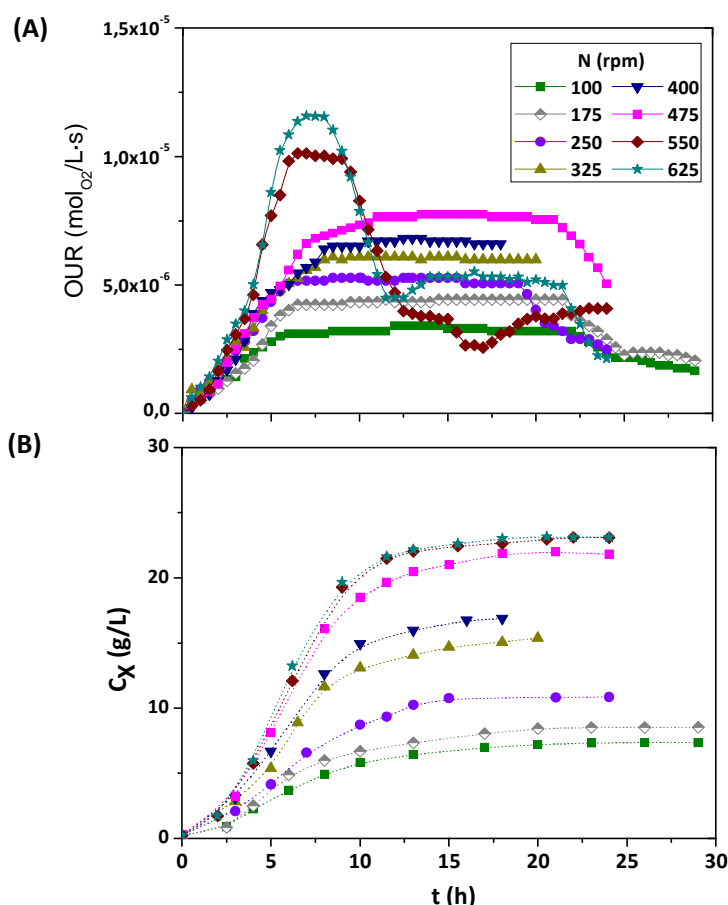


Figura 4.13 Influencia de la velocidad de agitación en **(A)** la velocidad de consumo de oxígeno y **(B)** la concentración de biomasa

En los experimentos cuya velocidad de agitación se encuentra entre 100 y 475 rpm, experimentos en los que se vio en la Figura 4.10 que la concentración de oxígeno disuelto permanece en cero durante prácticamente todo el intervalo de experimentación, la velocidad de consumo de oxígeno aumenta hasta llegar a un valor constante, plataforma determinada por las condiciones limitantes de transferencia de oxígeno. Así, para velocidades de agitación en las que el crecimiento está limitado por el transporte de oxígeno (entre 100 y 475 rpm), OUR aumenta desde el inicio del crecimiento hasta un tiempo de cultivo determinado a partir del cual $OUR=OTR$, tomando un valor prácticamente constante. En cuanto al segundo grupo de experimentos, en los que el oxígeno no es limitante (500 y 625 rpm), OUR presenta un incremento importante desde el inicio del crecimiento y hasta la mitad de la fase exponencial (en torno a las 7,5 h de crecimiento), donde alcanza su máximo valor. Bajo estas condiciones de operación, la evolución de OUR, durante el crecimiento de *R. terrigena*, sigue el comportamiento

típico observado en la mayoría de microorganismos en operación *batch* (Calik y col., 2004; Garcia-Ochoa y col., 2013; Olmos y col., 2013).

En base a la tendencia anteriormente comentada, y teniendo en cuenta las conclusiones extraídas del estudio de la influencia de la transferencia de oxígeno del apartado anterior, se puede afirmar que la producción de 2,3-BD está íntimamente relacionada con la actividad del microorganismo en condiciones de microaerobiosis (situación de limitación de oxígeno disponible), donde la ruta fermentativa toma el control de la ruta metabólica celular. Para mostrar más claramente este fenómeno, se ha analizado la influencia de velocidad de consumo de oxígeno en la velocidad de producción de 2,3-BD ($R_{2,3-BD}$), parámetro definido en la ecuación [4.11] que determina la concentración de producto que se genera por unidad de tiempo.

$$R_{2,3-BD} (g/L \cdot h) = \frac{dC_{2,3-BD}}{dt} \quad [4.11]$$

Como puede observarse en la Figura 4.14, las condiciones fluidodinámicas a las que se lleva a cabo la operación, que determinan la velocidad tanto de transferencia como de consumo de oxígeno, presentan una influencia directa, no sólo en la cantidad de 2,3-BD producido (como se observó en términos de rendimiento en la Figura 4.12(C)) sino también en la velocidad a la que tiene lugar la producción del diol. Existe un valor de consumo de oxígeno, que se relaciona con la actividad metabólica del microorganismo, para el cual la velocidad de producción es máxima. Esta velocidad de consumo de oxígeno es $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol}_{O_2}/L \cdot s$ y se consigue fijando la velocidad de agitación en 325 rpm. Por tanto, a través del pormenorizado estudio de la influencia de oxígeno en el proceso se concluye que éste es el valor óptimo de la velocidad de agitación cuando el proceso se lleva a cabo en un biorreactor tipo tanque agitado de 2L.

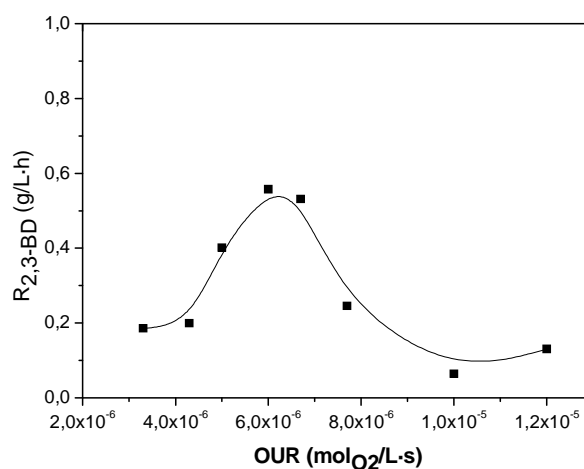


Figura 4.14 Influencia de la velocidad de consumo de oxígeno en la velocidad de producción de 2,3-BD.

4.4 ESTUDIO DE LA FORMA DE OPERACIÓN DEL PROCESO

Si bien en cualquier fermentación es deseable alcanzar una concentración elevada del producto en la corriente de salida, este objetivo se hace especialmente importante en el proceso estudiado en la presente Tesis Doctoral, debido a las dificultades técnicas encontradas en la separación del diol del resto de compuestos del caldo de cultivo. El fuerte carácter hidrofílico de esta molécula y su elevado punto de ebullición (180-184^o C a presión atmosférica), hacen que las operaciones *downstream* necesarias para la recuperación, purificación y aislamiento puedan llegar a tomar gran importancia en el balance económico del proceso, llegando a limitar incluso la viabilidad de la comercialización industrial del 2,3-BD (Afschar y col., 1993; Xiu y Zheng, 2008; Birajdar y col., 2015).

Son numerosas las investigaciones dirigidas a la mejora y optimización de las etapas de recuperación de 2,3-BD del caldo de fermentación, que engloban distintas operaciones de separación, tales como *steam stripping*, pervaporación, ósmosis inversa y extracción con disolventes (Anvari y Khayati, 2009; Jiang y col., 2009; Li y col., 2013; Birajdar y col., 2014; Jeon y col., 2014). Al margen de las limitaciones técnicas particulares de cada una de ellas, la baja concentración de 2,3-BD en el medio de cultivo constituye una barrera común a la implantación de cualquiera de ellas. En este sentido, algunos autores consideran que la concentración mínima de 2,3-BD que debe de contener el caldo al finalizar la fermentación es 80 g/L, valor a partir del cual se puede proceder a su separación de forma económicamente viable (Magge y Kosaric, 1987).

Este escenario deja visible la importancia de evaluar distintos modos de operación para llevar a cabo la fermentación, con la finalidad de alcanzar la máxima producción posible de 2,3-BD. En función de la forma de operación, se distingue entre procesos en discontinuo (*batch*), semicontinuo (*fed-batch*) y continuo.

Para llevar a cabo el proceso en tipo *batch*, se requiere partir de gran cantidad inicial de materia prima para poder alcanzar el intervalo de concentración de producto deseado. Sin embargo, esta estrategia puede conllevar problemas de inhibición por sustrato, derivados del uso de elevadas concentraciones iniciales de la fuente de carbono empleada, así como de inhibición provocada por las posibles impurezas que ésta contenga, especialmente si se trata de un residuo industrial que contenga compuestos citotóxicos (en el caso del glicerol: derivados fenólicos, furfural, metanol, etc.). Para evitar o mitigar estos problemas, numerosos autores que apuestan por la puesta en marcha del proceso a través de una operación de tipo semicontinuo,

mediante la alimentación escalonada o constante del sustrato (Yu y Saddler, 1983; Converti y Perego, 2002; Ma y col., 2009; Petrov y Petrova, 2009; Sun y col., 2009; Chen y col., 2010; Petrov y Petrova, 2010; Jurchescu y col., 2013; Yang y col., 2013; Tsvetanova y col., 2014; Li y col., 2015). Los resultados publicados en este campo son prometedores y serán expuestos y comparados con los obtenidos en esta investigación más adelante.

Por último, cabe la posibilidad de llevar a cabo la fermentación de forma continua. Sin embargo, este sistema conduce a bajos valores de rendimiento debido a la pérdida de sustrato carbonado en la corriente de salida del reactor y baja concentración de 2,3-BD en la misma, siendo la única solución posible encontrada hasta ahora la implantación de un sistema de recirculación de células (Pirt y Callow, 1958; Zeng y col., 1990a; Biebl y col., 1998; Nakashimada y col., 1998; Wong y col., 2014).

El objeto del presente Apartado es llevar a cabo un estudio de la forma de operación de la biotransformación de glicerina a 2,3-BD, empleando tanto glicerina pura como glicerol crudo proveniente de una planta de producción de biodiésel. El fermentador empleado es un biorreactor comercial de 2 L de volumen de trabajo tipo tanque agitado, operando en las condiciones de trabajo optimizadas previamente. En primer lugar se va a plantear el estudio del proceso en *batch*, para evaluar las posibles limitaciones de dicho modo de operación. Posteriormente y teniendo en cuenta las conclusiones obtenidas en dicho estudio, se evaluará la posibilidad de mejorar los resultados obtenidos mediante el desarrollo de la operación en *fed-batch* empleando distintas estrategias de alimentación de glicerina en pulsos.

4.4.1 ESTUDIO DEL PROCESO EN *BATCH*

Para la evaluación del proceso en discontinuo se ha planteado el estudio de influencia de la concentración inicial de sustrato, empleando para ello concentraciones de glicerina pura comprendidas en el rango de 35 y 210 g/L. La información de la planificación llevada a cabo se adjunta en la Tabla 4.9. En la Tabla II.7 del Anexo II se recogen los resultados obtenidos para dichos experimentos (evolución de biomasa, pH, glicerina y metabolitos producidos).

En la Figura 4.15 se muestra la evolución de la concentración de la biomasa, el consumo de glicerina y la producción de 2,3-BD a lo largo de cada experimento de este bloque, para cada una de las concentraciones iniciales de glicerina probadas. Como puede observarse, la concentración inicial de glicerina determina el crecimiento bacteriano y la velocidad del mismo. Cuanto menos es la concentración de sustrato, la tasa de crecimiento del microorganismo es mayor, como se refleja en la pendiente de la fase exponencial del crecimiento, y la

concentración final de biomasa alcanzada es también es mayor. Esta tendencia sugiere la existencia de fenómenos de inhibición por sustrato, uno de los mecanismos más comunes de regulación enzimática de las células.

Tabla 4.9 Planificación experimental realizada para el estudio del proceso en batch en biorreactor tipo tanque agitado de 2 L de volumen de trabajo. Condiciones: $T (^{\circ}\text{C}) = 30$; medio de cultivo 2; $C_G (\text{g/L}) = 30$; $N (\text{rpm}) = 325$; $Q_{\text{aire}} (\text{vvm}) = 1,5$; $\text{pH}_0 = 7,0$; Evolución libre de pH y posterior control a pH 5,5.

EXPERIMENTO	Tipo de Glicerina	$C_G (\text{g/L})$
G1	Pura	35
G2	Pura	80
G3	Pura	110
G4	Pura	140
G5	Pura	190
G6	Pura	210

Respecto a la tendencia observada en el consumo de sustrato carbonado, cabe destacar que no se alcanza el consumo total en todo el rango de concentraciones iniciales estudiadas. Para las concentraciones superiores, 190 y 210 g/L, el consumo de glicerina experimenta una ralentización en primer lugar y un estancamiento posteriormente, siendo las concentraciones de glicerina presentes en el caldo de cultivo al final del experimento 135 y 175 g/L, respectivamente. Si bien este hecho no es observado en el experimento G4, cuya concentración inicial de sustrato es 140 g/L, sí es destacable que en los puntos finales del experimento se observa una discreta ralentización del consumo de glicerina respecto a la experimentada en el inicio de la fermentación. Por otro lado, cuando se compara la evolución de la concentración de glicerina en los experimentos G1 a G3, correspondientes a concentraciones iniciales de glicerina más bajas comprendidas entre 35 y 110 g/L, se observan tendencias paralelas en todos ellos. A la luz de estos resultados, puede afirmarse que el sistema se encuentra inhibido cuando se emplean concentraciones elevadas de sustrato carbonado, fenómeno que va a imponer limitaciones en la implantación del proceso en tipo *batch*.

La inhibición por sustrato anteriormente descrita tiene también repercusión en la producción de 2,3-BD, cuya evolución se muestra en la Figura 4.15 (C). En los experimentos donde se observaba una ruptura con la tendencia general de consumo de sustrato, G5 y G6, la producción de 2,3-BD es mucho menor de lo esperada, experimentando de la misma forma que ocurría con la concentración de glicerina, una ralentización y ulterior parada.

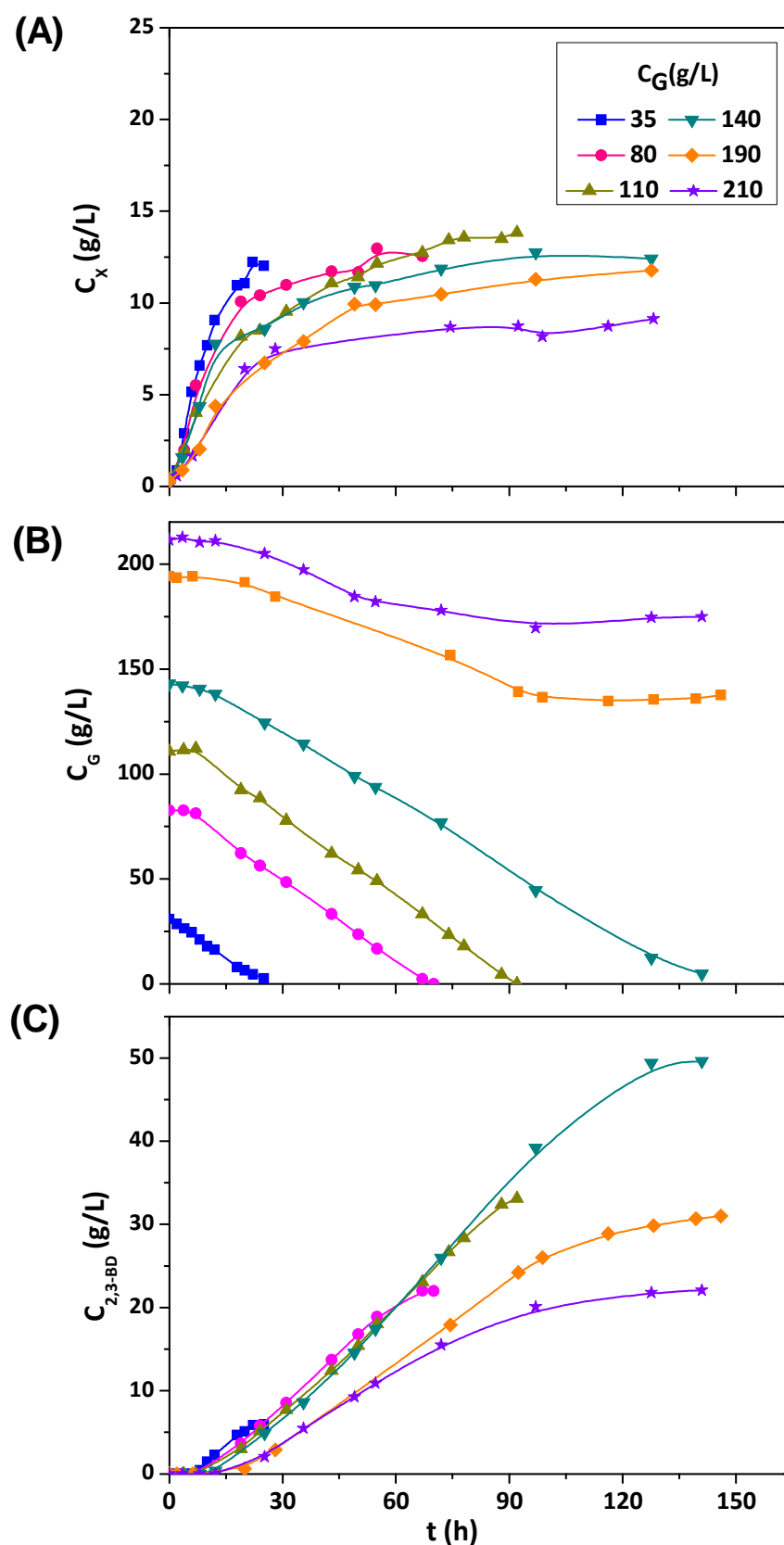


Figura 4.15 Evolución de **(A)** concentración de glicerina (C_G) y **(B)** concentración de 2,3-BD ($C_{2,3-BD}$) en los experimentos G1 a G6, correspondientes al estudio de diferentes concentraciones iniciales de glicerina cuando el proceso se lleva a cabo en discontinuo.

Si bien es llamativo, que la velocidad de producción de 2,3-BD para el resto de experimentos de este bloque (G1 a G4) es prácticamente idéntica en todos los casos, las diferencias se deben únicamente en la duración de cada experimento, marcada por el tiempo necesario para conseguir el consumo total de la fuente de carbono y que determina la concentración final de 2,3-BD alcanzada. La producción de 2,3-BD en todos los casos se inicia al mismo tiempo, aproximadamente a las 10 h de fermentación, y alcanza el máximo valor en el momento en el que se ha consumido prácticamente el total de la concentración inicial de glicerina. Por tanto, la concentración de 2,3-BD alcanzada es mayor cuanto mayor es la concentración inicial de glicerina, en el intervalo de concentraciones anteriormente citado. La concentración de 2,3-BD máxima más elevada alcanzada está en torno a los 50 g/L, valor muy prometedor pero inferior a la concentración mínima requerida (80 g/L) para poder llevar a cabo las operaciones de *downstream* de manera eficiente.

Debido al fenómeno de inhibición por sustrato anteriormente descrito, en el siguiente Apartado se plantea el desarrollo de la operación en modo *fed-batch*. Para ello es importante atender a la información sobre las limitaciones del sistema que se desprenden del estudio en discontinuo. Para establecer el límite de aplicabilidad de la operación en tipo *batch*, se va a proceder a evaluar la influencia de la concentración inicial de glicerina empleando los mismos parámetros empleados en los apartados anteriores para el estudio del pH y la influencia del oxígeno. A saber, conversión de glicerina, rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico y productividad de 2,3-BD, definidos en las ecuaciones [4.1] a [4.3]. Además se ha considerado relevante considerar otros dos parámetros, la velocidad de consumo de glicerina (R_G) y la velocidad de producción de 2,3-BD ($R_{2,3-BD}$), definidos según las ecuaciones [4.11] y [4.12], respectivamente.

$$R_G (g/L \cdot h) = dC_G/dt \quad [4.12]$$

En la Figura 4.16 se ha representado la conversión de glicerina (A), el rendimiento a 2,3-BD respecto el máximo teórico (B) y la productividad a 2,3-BD (C) en función de la concentración inicial de sustrato carbonado. Como puede observarse, para una concentración inicial de sustrato igual o menor a 110 g/L se alcanza la conversión completa. Sin embargo, a partir de este valor, la tendencia de este parámetro experimenta una abrupta caída, como consecuencia del fenómeno de inhibición anteriormente comentario, que controla la extensión de la biotransformación para concentraciones iguales o superiores a 140 g/L.

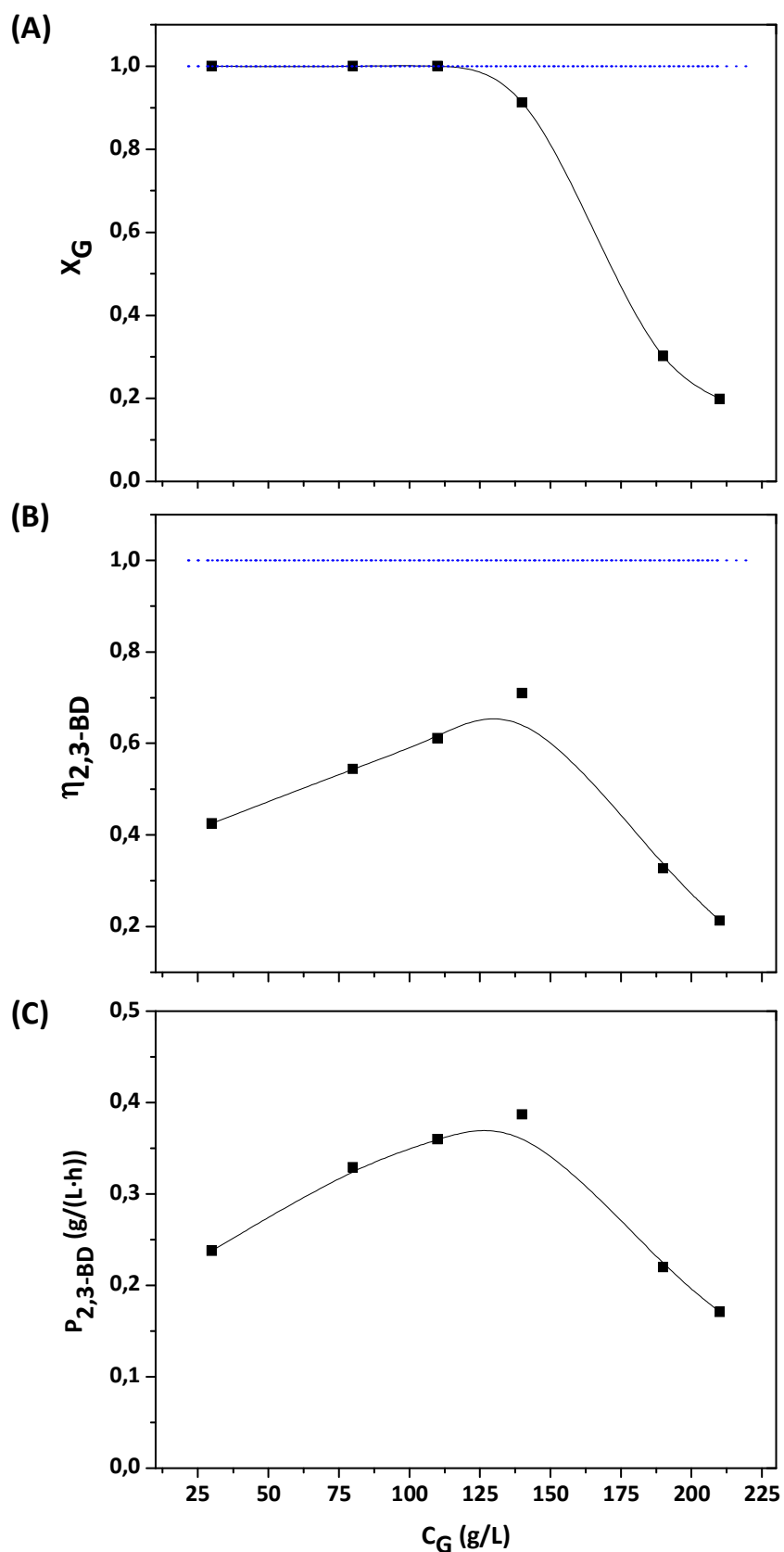


Figura 4.16 Influencia de la concentración inicial de glicerina en **(A)** conversión de glicerina, **(B)** rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico y **(C)** productividad de 2,3-BD, correspondiente al estudio de la influencia de la concentración inicial de glicerina en batch (experimentos G1 a G6).

La tendencia observada para el rendimiento a 2,3-BD respecto el máximo teórico y la productividad es análoga, caracterizada por un valor máximo de ambos parámetros cuando se emplea una concentración inicial de glicerina entre 110 y 140 g/L. A partir de ese valor, se observa una caída brusca en la tendencia. El valor máximo alcanzado de estos parámetros es 0,71 y 0,39 g/(L·h), respectivamente.

Sin embargo, cuando se analiza la tendencia de las velocidades de consumo de glicerina y de producción de 2,3-BD, mostradas en las Figura 4.17, las diferencias observadas en estos términos entre las concentraciones menores a 140 g/L son insignificantes. En el rango de concentraciones comprendido entre 35 y 140 g/L, la velocidad de consumo de glicerina en todos los experimentos está en torno a 1,25 g/(L·h) y la velocidad de producción de 2,3-BD en torno a 0,40-0,45 g/(L·h). Se concluye que para llevar a cabo la operación en *fed-batch* es importante no sobrepasar concentraciones iniciales de glicerina superiores a 140 g/L, para mantener el valor máximo observado de dichas variables y evitar los problemas de inhibición derivados del uso de elevadas concentraciones de sustrato carbonado. Además se ha observado que la concentración máxima de 2,3-BD se obtiene un poco antes del consumo total de la glicerina. A partir de ese momento, el metabolismo bacteriano cambia debido a la falta de sustrato y la bacteria comienza a consumir el 2,3-BD como fuente de carbono, dando lugar a la acumulación en el caldo de cultivo de la molécula precursora en la ruta, la acetoína. Por tanto, es imprescindible llevar a cabo la alimentación de los pulsos de glicerina antes del agotamiento total del sustrato en el caldo de cultivo.

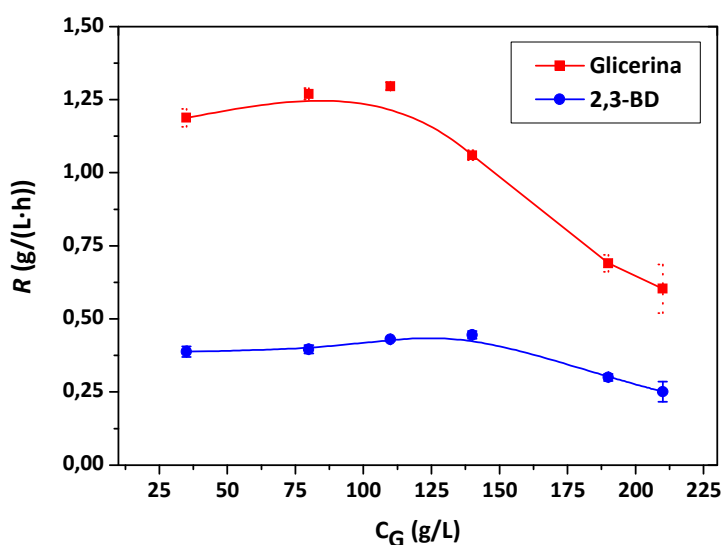


Figura 4.17 Influencia de la concentración inicial de glicerina en la velocidad de consumo de sustrato y la velocidad de producción de 2,3-BD, correspondiente al estudio de la influencia de la concentración inicial de glicerina en batch (experimentos G1 a G6).

4.4.2 ESTUDIO DEL PROCESO EN FED-BATCH

A la luz de las conclusiones extraídas en el estudio de la operación en discontinuo, el presente apartado tiene como objeto evaluar la viabilidad del proceso cuando se lleva a cabo de manera semicontinua. Para alcanzar dicho objetivo se ha planteado la posibilidad de alimentar el sustrato carbonado en pulsos, desarrollando distintos perfiles de concentración de glicerina, siempre atendiendo a las limitaciones extraídas del estudio anterior: la concentración de glicerina nunca debe superar los 140 g/L y se debe evitar el consumo total del sustrato entre pulso y pulso, para lo que se ha establecido 20 g/L como concentración mínima límite de glicerina. La planificación experimental realizada se recoge en la Tabla 4.11, que engloba dos experimentos en *fed-batch* con perfiles de glicerina diferentes. Los resultados referentes a la evolución de la concentración del sustrato carbonado y los distintos metabolitos figuran en las Tablas II.8 e II.9 del Anexo II.

Tabla 4.10 Planificación experimental realizada para el estudio del proceso en *fed-batch* en biorreactor tipo tanque agitado de 2 L de volumen de trabajo. Condiciones: $T(^{\circ}\text{C}) = 30$; medio de cultivo 2; $C_G \text{ (g/L)} = 30$; $N \text{ (rpm)} = 325$; $Q_{\text{aire}} \text{ (vvm)} = 1,5$; $\text{pH}_0 = 7,0$; Evolución libre de pH y posterior control a pH 5,5.

EXPERIMENTO	C_G^{total}	Perfil C_G	C_G^{total} alimentada
	(g/L)	(g/L)	(g/L)
G7	Pura	$100 + 2 \cdot (50)$	200
G8	Pura	$50 + 2 \cdot (90)$	230

En la Figura 4.18 se muestra la evolución de la composición del caldo de cultivo para para ensayo perteneciente a este bloque experimental. La evolución de cada una de las especies seguidas es similar en ambos casos. La fase estacionaria del microorganismo se alcanza en las primeras horas de experimentación. El consumo de glicerina observado es constante durante las diferentes alimentaciones realizadas, a pesar de que el perfil de glicerina es diferente. A partir de las 168 h aproximadamente se observa una detención del consumo de sustrato carbonado. Este fenómeno es observado también en la tendencia de la producción de 2,3-BD, que comienza en torno a las 10-12 h y es constante hasta ese momento. A pesar de que en cada pulso de glicerina se alimenta también medio de cultivo fresco con la finalidad de introducir micronutrientes necesarios para el mantenimiento celular, estos resultados parecen indicar la pérdida de viabilidad celular o bien actividad metabólica de las células del cultivo pasados 7 días de experimentación.

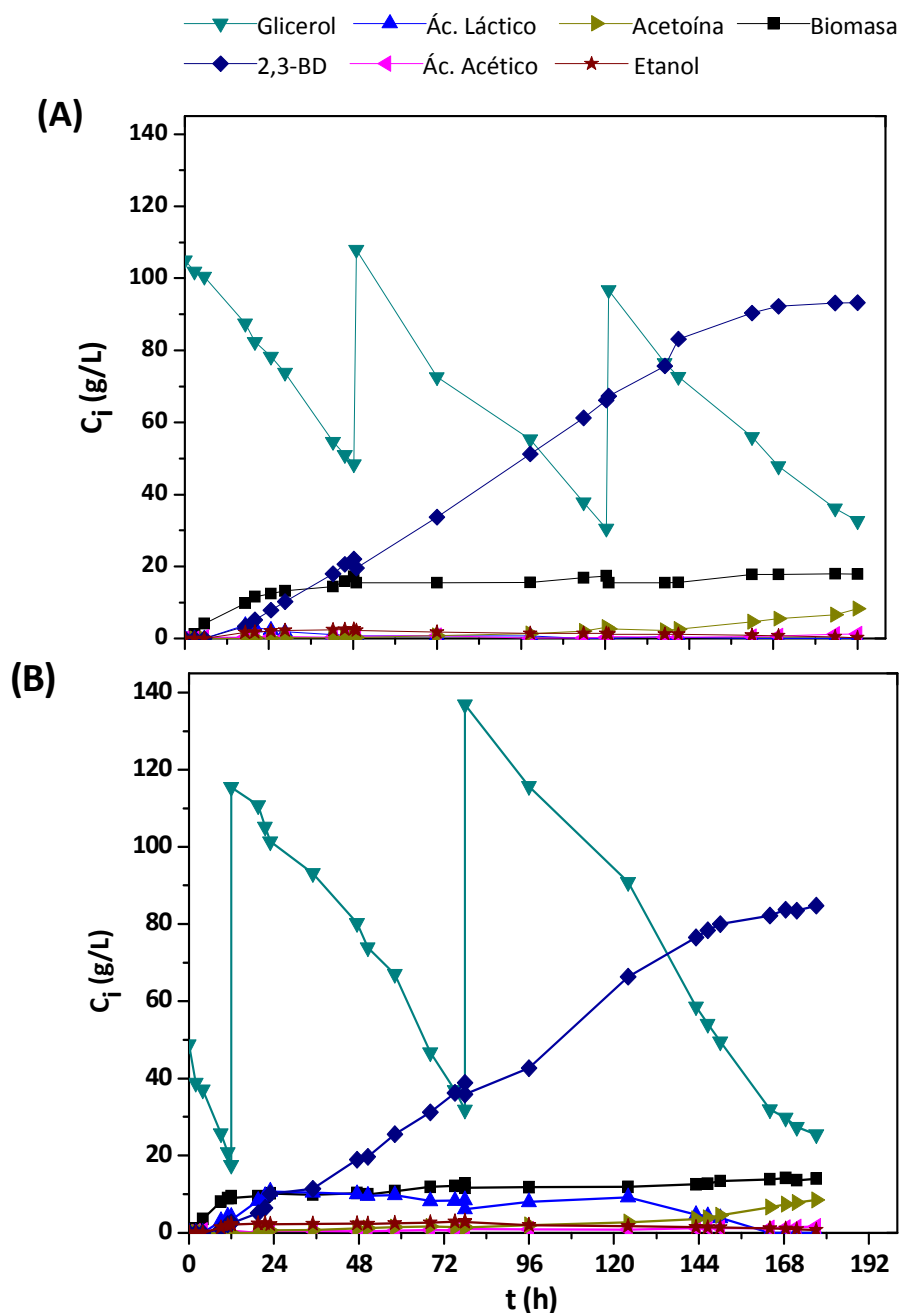


Figura 4.18 Evolución de la concentración de glicerina, 2,3-BD y el resto de metabolitos de la ruta así como de la concentración de biomasa para los distintos experimentos en *fed-batch* (A) experimento G7 y (B) experimento G8.

A las 192 h de experimentación, la concentración de 2,3-BD alcanzada en cada una de las fermentaciones es 93,3 y 84,8 g/L, respectivamente, siendo éste prácticamente el único metabolito presente en el caldo de cultivo al finalizar el experimento. Este hecho, junto con la elevada concentración de producto alcanzada, es una clara ventaja para las posteriores operaciones de purificación del mismo. Sin embargo, la glicerina sin consumir aún presente en el caldo de cultivo puede ser una dificultad técnica para alcanzar dicho objetivo. Por ello se planteó

un tercer experimento en *fed-batch*, con un perfil de glicerina diferente que asegure el consumo total del sustrato carbonado al finalizar el experimento a los 7 d. En la Tabla 4.11 se muestra la información sobre dicho experimento y en la Tabla II.10 del Anexo II se adjuntan los resultados obtenidos del mismo.

Tabla 4.11 Planificación experimental realizada para el estudio del proceso en *fed-batch* en biorreactor tipo tanque agitado de 2 L de volumen de trabajo. Condiciones: $T(^{\circ}\text{C}) = 30$; medio de cultivo 2; $C_G (\text{g/L}) = 30$; $N (\text{rpm}) = 325$; $Q_{\text{aire}} (\text{vvm}) = 1,5$; $\text{pH}_0 = 7,0$; Evolución libre de pH y posterior control a pH 5,5.

EXPERIMENTO	C_G^{total}	Perfil C_G	C_G total alimentada
	(g/L)	(g/L)	(g/L)
G9	Pura	$60 + 5 \cdot (30)$	210

En la Figura 4.19 se ha representado la evolución de la concentración de biomasa, concentración de glicerina y 2,3-BD así como el resto de subproductos de la ruta metabólica analizados en el caldo de cultivo. La tendencia observada es la esperada según las conclusiones extraídas de los experimentos G7 y G8: se alcanza el consumo total del sustrato carbonado con una producción constante de 2,3-BD que alcanza los 90,5 g/L. El caldo de cultivo al finalizar el experimento está compuesto principalmente por 2,3-BD y su precursor de la ruta metabólica, la acetoína. Se detecta además una pequeña cantidad de ácido acético, 2,25 g/L, así como la concentración de biomasa de 15 g/L.

En la Tabla 4.12 se incluyen los resultados de los experimentos realizados en este apartado en términos de conversión de glicerina (respecto al total alimentado), rendimiento de 2,3-BD respecto al teórico y productividad. Todos los resultados mejoran notablemente los valores obtenidos en los estudios previos realizados en este trabajo, siendo los valores alcanzados en el experimento G9 son especialmente interesantes por la mejora en productividad alcanzada [0,52 g/(L·h)]. Para evaluar la competitividad del proceso desarrollado en este estudio, en el Apartado 4.6 se establecerá una comparación detallada de estos resultados con los publicados por otros autores en bibliografía.

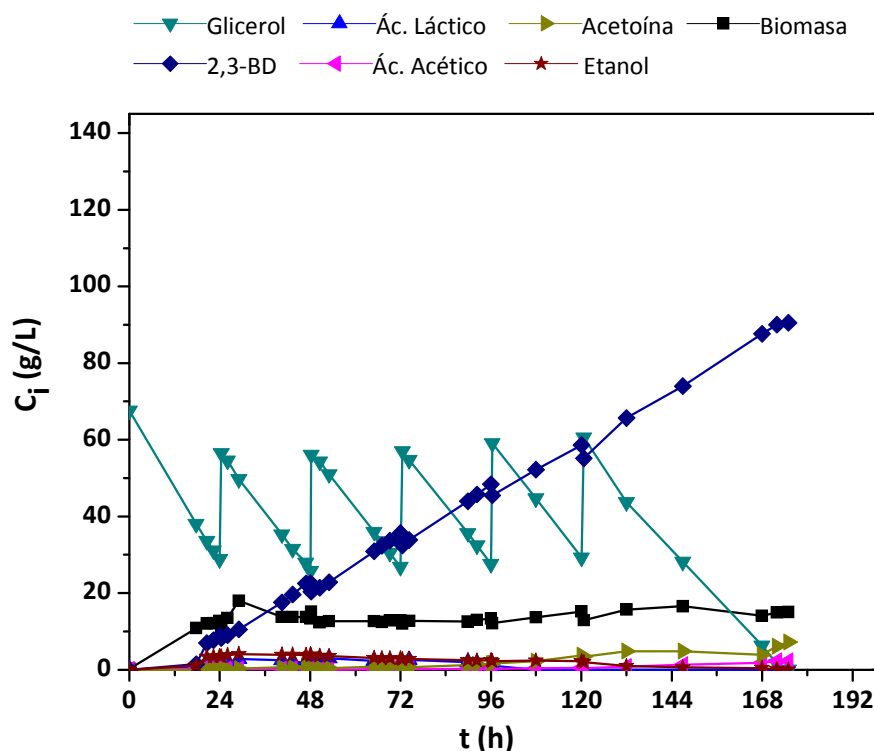


Figura 4.19 Evolución de la concentración de glicerina, 2,3-BD y el resto de metabolitos de la ruta así como de la concentración de biomasa para el experimento G9.

Tabla 4.12 Resultados de conversión de glicerina, rendimiento de 2,3-BD respecto al máximo teórico y productividad de 2,3-BD en los experimentos G7 a G9.

EXPERIMENTO	X_G	$\eta_{2,3-BD}$	$P_{2,3-BD}$ [g/(L·h)]
G7	0,84	0,961	0,49
G8	0,89	0,757	0,48
G9	1,00	0,879	0,52

4.5 DESARROLLO DEL PROCESO EMPLEANDO GLICEROL CRUDO COMO FUENTE DE CARBONO

Para finalizar el estudio del proceso de producción de 2,3-BD a partir de glicerina empleando células en crecimiento, es necesario evaluar la posibilidad de desarrollar la operación empleando como fuente de carbono glicerol crudo, residuo del proceso de producción de biodiésel. Para ello se han llevado a cabo varios experimentos, realizados en las condiciones de operación previamente optimizadas para el proceso cuando se empleó glicerina pura (estrategia de control de pH, velocidad de agitación óptima, concentración inicial de glicerina). La planificación experimental realizada en este apartado se incluye en la Tabla 4.13, que incluye

experimentos en modo *batch* y *fed-batch* tanto con glicerina cruda como con glicerina pura, para evaluar las posibles diferencias derivadas del empleo del residuo como fuente de carbono. Asimismo se incluyen experimentos con concentración inicial de glicerina 75-80 y 130-140 g/L, y un experimento en *fed-batch*, con el perfil de alimentación de glicerina que proporcionó los mejores resultados. En las Tablas II.11 a II.13 del Anexo II se incluyen los resultados experimentales obtenidos en los experimentos que emplean glicerol crudo como sustrato, dado que los resultados obtenidos para los experimentos con glicerina pura ya fueron incluidos en el apartado anterior.

Tabla 4.13 Planificación experimental realizada para el estudio del proceso con glicerina cruda, residuo del proceso de producción de biodiésel; biorreactor tipo tanque agitado de 2 L de volumen de trabajo. Condiciones: $T (^{\circ}\text{C}) = 30$; medio de cultivo 2; $C_G (\text{g/L}) = 30$; $N (\text{rpm}) = 325$; $Q_{\text{aire}} (\text{vvm}) = 1,5$; $\text{pH}_0 = 7,0$; Evolución libre de pH y posterior control a pH 5,5.

Forma de operación	EXPERIMENTO	$C_G (\text{g/L})$	Tipo de Glicerina
<i>Batch</i>	G2	75-80	Pura
	C1		Cruda
	G4	130-140	Pura
	C2		Cruda
<i>Fed-Batch</i>	G9	$60 + 5 \cdot (30)$	Pura
	C3		Cruda

En la Figura 4.20 se ha representado la evolución de la concentración de biomasa (A), la concentración de glicerina (B) así como de 2,3-BD (C) de los experimentos correspondientes al bloque experimental abordado en este Apartado. Respecto a la evolución del crecimiento bacteriano, cabe destacar que cuando la operación se lleva a cabo en *batch* la concentración de biomasa máxima alcanzada es mayor cuando se emplea glicerol crudo respecto al crecimiento observado con la glicerina pura. Este fenómeno puede ser debido a que las impurezas que contiene el residuo empleado como sustrato, tales como sales de fosfato y cloruros, lejos de actuar como inhibidores del crecimiento, actúan como factores de crecimiento.

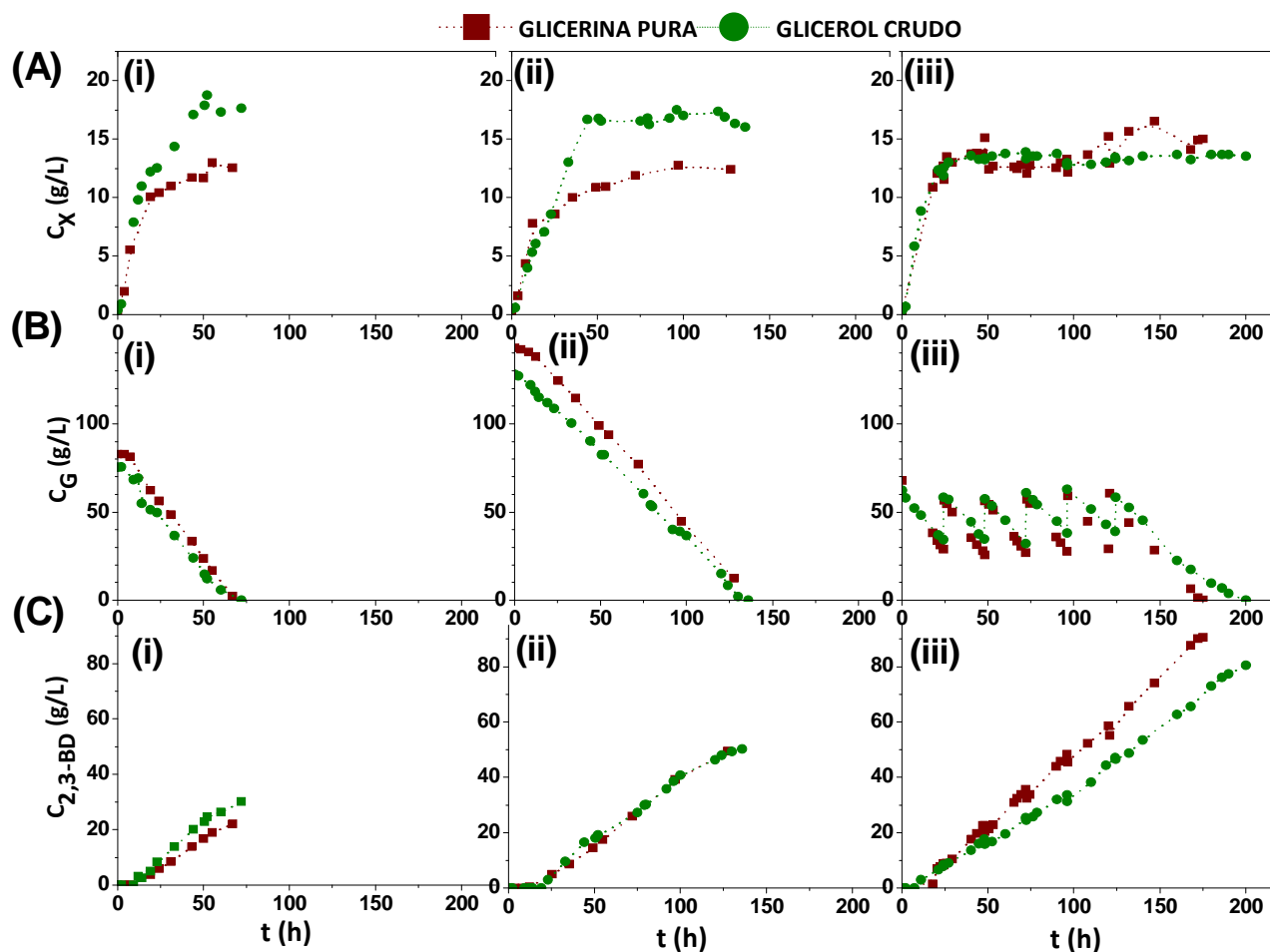


Figura 4.20 Comparación de la evolución de **(A)** concentración de biomasa, **(B)** concentración de glicerina y **(C)** concentración de 2,3-BD en los experimentos realizados con glicerina pura y cruda en **(i)** batch con concentración inicial de glicerina 75-80 g/L, **(ii)** batch con concentración inicial de glicerina 130-140 g/L y **(iii)** fed-batch con perfil de glicerina 60 g/L de concentración inicial y adiciones periódicas de 30 g/L.

Asimismo, en la operación realizada en *fed-batch* (experimentos G9 y C3), la evolución de la concentración de biomasa es similar en ambos casos, observándose que se alcanza la fase estacionaria del crecimiento a un tiempo menor respecto a la tendencia observada en los casos anteriores, en los experimentos tipo *batch*. El momento en que se alcanza la fase estacionaria coincide en ambos casos con la adición del primer pulso de glicerina (pura o cruda en cada caso). Este fenómeno puede estar vinculado con la inhibición por sustrato que se contempló en el estudio de diferentes concentraciones iniciales de glicerina en *batch*, abordado en el Aparato 4.4.1 de este Capítulo.

En relación al consumo de la fuente de carbono, puede apreciarse en la citada figura que la evolución de la concentración de glicerina es independiente de la naturaleza del sustrato empleado, siendo similares en todos los casos. Por último, respecto a la producción de 2,3-BD alcanzada, los resultados obtenidos son realmente prometedores. En los experimentos llevados

a cabo en *batch*, la producción obtenida con el glicerol crudo es igual o incluso superior a cuando se emplea glicerina pura. En el caso del experimento en *fed-batch*, la producción 2,3-BD a partir de glicerol crudo se ve ligeramente ralentizada respecto a cuándo la glicerina pura es empleada como sustrato, pudiendo deberse a la acumulación en el caldo de cultivo de las impurezas presentes en el residuo empleado como sustrato en cada nuevo pulso.

La concentración final alcanzada de 2,3-BD en los experimentos llevados a cabo con glicerol crudo es 30,2, 50,1 y 80,5 g/L, frente a las concentraciones alcanzadas con glicerina pura en las mismas condiciones: 22,0, 49,4 y 90,5 g/L. En la Tabla 4.14 se ha adjuntan los resultados comparativos de los experimentos realizados en este bloque experimental en términos de concentración final de 2,3-BD, conversión de glicerina, rendimiento a 2,3-BD respecto a la concentración inicial de glicerina y productividad. A pesar de las pequeñas diferencias anteriormente comentadas, los resultados obtenidos para la producción de 2,3-BD a partir del residuo empleado como sustrato son muy prometedores. La concentración de 2,3-BD alcanzada en el experimento en *fed-batch* es lo suficientemente elevada para que se considere el glicerol crudo como un sustrato potencial para la producción bacteriana de 2,3-BD a nivel industrial empleando como biocatalizador *R. terrigena*.

Tabla 4.14 Resultados de conversión de glicerina, rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico y productividad de 2,3-BD en los experimentos que constituyen este bloque experimental.

EXPERIMENTO	Glicerina	C _G (g/L)	C _{2,3-BD} (g/L)	X _G	η _{2,3-BD}	P _{2,3-BD} [g/(L·h)]
G2	Pura	75-80	22,0	1,00	0,552	0,33
C1	Cruda		30,2	1,00	0,818	0,42
G4	Pura	130-140	49,4	0,91	0,716	0,39
C2	Cruda		50,1	1,00	0,798	0,37
G9	Pura	60 + 5·(30)	90,5	1,00	0,879	0,52
C3	Cruda		80,5	1,00	0,900	0,40

4.6 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTE ESTUDIO CON LOS RESULTADOS PUBLICADOS EN BIBLIOGRAFÍA

Por último, es necesario situar los resultados obtenidos en este estudio respecto a los publicados en otras investigaciones del mismo campo con el fin de poder evaluar cuál es la competitividad real del proceso aquí desarrollado respecto a diferentes cepas/condiciones de

operación empleadas por otros autores. Para ello, se procedió a llevar a cabo una revisión bibliográfica de los trabajos publicados en literatura centrados en la bioconversión de glicerina en 2,3-BD. Si bien son numerosas las investigaciones publicadas en torno a la producción por vía biotecnológica de 2,3-BD a partir de otros sustratos (glucosa y residuos que contengan este azúcar, principalmente), los trabajos encontrados en torno al desarrollo del proceso a partir de glicerina (bien pura, bien cruda) son bastante escasos. La novedad del campo de la presente investigación ha facilitado la búsqueda bibliográfica en tanto que la ha acotado a los últimos años (el primer trabajo publicado data de 2009). Para el desarrollo de este epígrafe además se han descartado aquellos trabajos descriptivos de nuevas cepas productoras (*wildtype*, microorganismos modificados genéticamente) cuyos resultados no están suficientemente avanzados para alcanzar producciones competitivas, si bien abren puertas al desarrollo del proceso con microorganismos seguros y potencialmente efectivos.

En la Tabla 4.15 se adjunta la información recopilada en la revisión bibliográfica así como los mejores resultados obtenidos en la presente investigación para proceder a su comparación. Se ha considerado importante recopilar cuál es el microorganismo empleado en cada caso así como su clasificación en materia de seguridad biológica, punto capital en la toma de decisiones para la implantación de una operación a escala industrial, tal y como ha sido expuesto en el Capítulo 3. Además se adjunta información sobre el tipo de glicerina alimentada, concentración de la misma empleada (cuando esta información está disponible) así como si se suplementa el medio de cultivo con cualquier otro tipo de sustrato carbonado, que puede encarecer la economía del proceso y dar lugar a valores de concentración de 2,3-BD y rendimientos no totalmente comparables con nuestro proceso, dado que existe un sustrato adicional que puede ser metabolizado por el microorganismo en la ruta fermentativa ácido-mixta y dar, por tanto, valores de concentración de 2,3-BD no relacionables únicamente a la bioconversión de la glicerina.

Los parámetros incluidos en la Tabla para establecer una comparación son la concentración de 2,3-BD alcanzada, productividad así como rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico en función de la concentración inicial de glicerina alimentada ($\eta_{2,3-BD}$) así como en función de la concentración consumida de glicerina ($\eta^*_{2,3-BD}$). Esta distinción entre ambos parámetros de rendimiento es necesaria debido a que en algunos casos la información facilitada por los autores es incompleta para determinar el rendimiento respecto a la concentración inicial de sustrato carbonado y no permite establecer comparaciones entre los distintos trabajos.

La información recopilada se ha agrupado según el modo de operación empleado, *batch* y *fed-batch*, para poder establecer la comparación más fácilmente entre aquellos resultados que se hayan obtenido en las mismas condiciones respecto al modo de operación. Respecto a los resultados publicados en modo de operación *batch*, la concentración inicial de glicerina está en el mismo rango en todos los trabajos (75-80 g/L). Este hecho, junto con que en ninguno de ellos se emplee una fuente adicional de carbono, hace totalmente comparable los resultados entre sí. La concentración alcanzada de 2,3-BD en esta investigación es la más alta dentro de los resultados incluidos en este modo de operación. Los parámetros de rendimiento y productividad se encuentran dentro del rango de los resultados publicados. Los resultados publicados con los géneros *Klebsiella* y *Serratia*, proporcionan similares rendimientos pero productividades más bajas. Mientras que los resultados publicados con *B. amyloliquefaciens* muestra una productividad parecida a la obtenida en esta investigación pero con rendimientos más bajos. Por tanto, se concluye que los resultados obtenidos con *R. terrigena* son mejores que los encontrados en la revisión bibliográfica realizada.

Respecto a los resultados publicados obtenidos en *fed-batch*, el intervalo de concentración de 2,3-BD obtenido en el presente estudio (80-90 g/L) es lo suficientemente alto para considerar este proceso competitivo y mejora notablemente los resultados publicados hasta el año 2015, correspondientes a las investigaciones publicadas por Petrov y Petrova en 2009 y 2010 y Yang y colaboradores en 2013. Sin embargo, en el último año un par de trabajos han sido publicados con resultados brillantes: concentraciones de 2,3-BD que superan 100 g/L. La investigación realizada con *B. amyloliquefaciens* emplea una fuente adicional de sustrato (melazas de remolacha), que implica la alimentación de glucosa y fructosa. En un trabajo previo publicado por los mismos autores (Yang et col., 2013) se muestra la influencia del empleo de melazas como suplemento del medio de cultivo en la producción de 2,3-BD, experimentando un aumento de la concentración de 2,3-BD alcanzada del 75%. Por tanto, estos resultados no son fácilmente comparables con los que se obtienen cuando se emplea glicerol como única fuente de carbono.

Por último, si bien los resultados publicados por Cho y colaboradores en 2015 muestran concentraciones de 2,3-BD alcanzadas muy buenas, con excepcionales valores de productividad, el empleo de un microorganismo de tipo 2 en materia de seguridad biológica, como es *K. oxytoca*, impone una barrera insalvable a la aplicación del proceso desarrollado por estos autores a nivel industrial.

A la vista de la información extraída en la revisión bibliográfica realizada, se concluye que el proceso de producción de 2,3-BD empleando como biocatalizador células en crecimiento de *R. terrigena* apunta a ser una alternativa potencialmente viable y competitiva de revalorización del glicerol, residuo del proceso de producción de biodiésel. Si bien, es necesario continuar en la profundización del estudio del proceso para alcanzar la implantación a nivel industrial, especialmente en lo referente al escalado del proceso, que puede imponer nuevas limitaciones al tomar importancia otros fenómenos de transferencia de materia.

Tabla 4.15 Comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los resultados publicados en bibliografía por otros autores.

Microorganismo	Clase	Glicerina			Fuentes de carbono suplementarias	Forma de operación	C _{2,3-BD} (g/g)	$\eta_{2,3-BD}$ (g/g)	$\eta_{2,3-BD}^*$ (g/g)	P _{2,3-BD} (g/L·h)	Referencia
		Tipo	C _G ⁰ (g/L)	C _G [*] (g/L)							
<i>Klebsiella sp.</i>	2	Pura	75	-	-	Batch	29,3	0,798	-	0,34	Huang et col., 2013
<i>Serratia sp.</i>	1	Pura	75	-	-	Batch	30,0	0,818	-	0,36	Huang et col., 2013
<i>B. amyloliquefaciens</i>	1	Cruda	80	55	-	Batch	19,4	0,491	0,716	0,40	Yang et col., 2013
<i>R. terrigena</i>	1	Pura	80	80	-	Batch	49,4	0,716	0,716	0,39	Este trabajo
<i>R. terrigena</i>	1	Cruda	75	75	-	Batch	50,1	0,798	0,798	0,37	Este trabajo
<i>K. pneumoniae</i>	2	Pura	-	138	-	Fed-Batch	49,2	-	0,736	0,18	Petrov and Petrova, 2009
<i>K. pneumoniae</i>	2	Pura	-	180	-	Fed-Batch	70,0	-	0,798	0,47	Petrov and Petrova, 2010
<i>B. amyloliquefaciens</i>	1	Cruda	-	113	-	Fed-Batch	43,1	-	0,777	0,45	Yang et col., 2013
<i>B. amyloliquefaciens</i>	1	Cruda	235	225	Melazas (44 g/L)	Fed-Batch	102,3	0,900	0,920	1,16	Yang y col. 2015b
<i>K. oxytoca</i>	2	Pura	310	297	-	Fed-Batch	115,0	0,798	0,818	1,01	Cho y col. 2015
<i>K. oxytoca</i>	2	Cruda	345	300	-	Fed-Batch	131,5	0,777	0,900	0,84	Cho y col. 2015
<i>R. terrigena</i>	1	Pura	210	210	-	Fed-Batch	90,5	0,879	0,879	0,52	Este trabajo
<i>R. terrigena</i>	1	Cruda	182	182	-	Fed-Batch	80,5	0,900	0,900	0,40	Este trabajo

4.7 BIBLIOGRAFÍA

Afschar, A. S.; Rossell, C. E. V.; Jonas, R.; Quesada, A. y Schaller, K. (1993). Microbial production and downstream processing of 2,3-butanediol. *Journal of Biotechnology*, 27, 317-329.

Anvari, M. y Khayati, G. (2009). In situ recovery of 2,3-butanediol from fermentation by liquid-liquid extraction. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36: 313-317.

Anvari, M. y **Motlagh**, M. R. S. (2010). Enhancement of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* PTCC 1402. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011: 636170.

Beronio, P. B. y **Tsao**, G. T. (1993). Optimization of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* through oxygen transfer rate control. *Biotechnology and Bioengineering*, 42: 1263-1269.

Birajdar, S. D.; Padmanabhan, S. y Rajagopalan, S. (2014). Repulsive effect of salt on solvent extraction of 2,3-butanediol from aqueous fermentation solution. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(8): 1455-1462.

Birajdar, S. D.; Rajagopalan, S.; Sawant, J. S. y Padmanabhan, S. (2015). Continuous countercurrent liquid-liquid extraction method for the separation of 2,3-butanediol from fermentation broth using n-butanol and phosphate salts. *Process Biochemistry*, 50: 1449-1458.

Cho., S.; Kim, T.; Woo, H. M.; Kim, Y.; Lee, J. y Um, Y. (2015). High production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1. *Biotechnology for biofuels*, 8: 146-158.

Blanch, H.W. y **Clark** D.S. (1997). Transport process in biochemical engineering. Ed. Marcel Dekker. New York.

Blieb, H.; Zeng, A.; Menzel, K. y Deckwer, W. D. (1998). Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50: 24-29.

Blomqvist, K.; Nikkola, M.; Lehtovaara, P.; Suihko, M. L.; Airaksinen, U.; Straby, K. B.; Knowles, J. K. y Penttila, M. E. (1993). Characterization of the genes of 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology*, 175(5): 1392-1404.

Calik, P.; Yilgör, P.; Ayhan P. y Demir, A.S., (2004). Oxygen effects on benzaldehyde lyase production. *Chemical Engineering Science*, 59: 5075-5083.

Celinska, W. y Grajek, W. (2009).Biotechnological production of 2,3-butanediol – Current state and prospects. *Biotechnology Advances*, 27: 715–725.

Chen, Z.; Liu, H.; Zhang, J. y Liu, D. (2009).Cell physiology and metabolic flux response of *Klebsiella pneumoniae* to aerobic conditions. *Process Biochemistry*, 44: 862-868.

Chen, K.; Liu, Q.; Zhang, J.; Li, J.; Xu, J. y Wang, G. (2010). Improved 2,3-butanediol production from corn cob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. *Process Biochemistry*, 45 (4): 613-616.

Cho, S.; Kim, T.; Woo, H. M.; Kim, Y.; Lee, J. y Um, Y. (2015). High production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1. *Biotechnology for Biofuels*, 8: 146-158.

Converti, A. y Perego, P. (2002) Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 303-309.

Doran, P. M. Bioprocess Engineering Principles. Second Edition. Academic Press. **2013**. Capítulo 1.

Durmin, G.; Clomburg, J.; Yeates, Z.; Alvarez, P. J. J.; Zygorakis, K.; Campbell, P. y Gonzalez, R. (2008) Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 103 (1): 148 – 161.

Ensari, S. y Lim, H. C. (2003). Kinetics of L-Lysine fermentation: a continuous culture model incorporating oxygen uptake rate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 35-40.

Escobar, S. (2013). Estudio del transporte y consumo de oxígeno en cultivos bacterianos: estrés hidrodinámico. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Escobar, E.; Rodriguez, A.; Gomez, E.; Alcon, A.; Santos, V. E. y Garcia-Ochoa, F. (2016). Influence of oxygen transfer on *Pseudomonas putida* effects on growth rate and biodesulfurization capacity. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(4): 545-554.

Faveri, D.; Torre, P.; Molinari, F.; Perego, P. y Converti, A. (2003). Carbon material balances and bioenergetics of 2,3-butanediol bio-oxidation by *Acetobacter Hansenii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 708-719.

Garcia-Ochoa, F., Gomez Castro, E. y Santos, V. E. (2000). Oxygen transfer and uptake rates during xantan gum production. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 680-690.

Garcia-Ochoa, F. y Gomez, E. (2004). Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chemical Engineering Science*, 59: 2489-2501.

Garcia-Ochoa, F. y Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27: 153 – 176.

Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E.; Santos, V. E. y Merchuk, J. C. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 49: 289-307.

Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E.; Alcon, A. y Santos, V.E. (2013). The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 36: 911-925

Garcia-Ochoa, F.; Escobar, S. y Gomez, E. (2015). Specific oxygen uptake as indicator of cell response of *Rhodococcus erythropolis* cultures to shear effects. *Chemical Engineering Science*, 122: 491-499.

Gomez, E.; Santos V.; Alcon, A.; Martin A.B. y Garcia-Ochoa F. (2006). Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: effect on growth and BDS capability. *Chemical Engineering Science*, 61: 4595-4604.

Han, S.; Lee, J.; Park, K. y Park, Y. (2012). Production of 2,3-butanediol by a low-acid producing *Klebsiella oxytoca* NBRF4. *New Biotechnology*, 30(2): 166-172.

Hoefnagel, M. H. N.; Starrenburg, M. J. C.; Martens, D. E.; Hugenholtz, J.; Kleerenbezem, M.; Swam, I. I. V.; Bongers, R.; Westterhoff, H. V. y Snoep, J. L. (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria, the combined approach: kinetic modelling, metabolic control and experimental analysis. *Microbiology*, 148: 1003-1013.

Huang, C.; Jiang, Y.; Guo, G. y Hwang, W. (2013). Method of 2,3-butanediol production from glycerol and acid-pretreated rice straw hydrolysate by newly isolated strains: Pre-evaluation as an integrated biorefinery process. *Bioresource Technology*, 135: 446-453.

Van Hoek, P.; Aristidou, A. y Rush, B. Fermentation process using specific oxygen uptake rates as a process control. Número de publicación: **US 08828707**, 9 de Septiembre de 2014.

- Jantama, K.;** Polyiam, P.; Khunnonkwao, P.; Chan, S.; Sangproo, M.; Khor, K.; Jantama, S. S. y Kanchanatawee, S. (2015). Efficient reduction of the formation of by-products and improvement of production yield of 2,3-butanediol by a combined deletion of alcohol dehydrogenase, acetate kinase-phosphotransacetylase, and lactate dehydrogenase genes in metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* in mineral salts medium. *Metabolic Engineering*, 30: 16-26.
- Jeon, S.;** Kim, D.; Song, H.; Lee, H. J.; Park, S.; Seung, D. Y Chang, Y. K. (2014). 2,3-Butanediol recovery from fermentation broth by alcohol precipitation and vacuum distillation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117 (4): 464-470.
- Ji, X.;** Huang, H.; Zhu, J.; Ren, L.; Hu, N. y Li, S. (2009). Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. *Bioresource Technology*, 100: 3410-3414.
- Ji, X.;** Huang, H. y Ouyang, P. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: A state of the art review. *Biotechnology Advances*, 29: 351–364.
- Jiang, B.;** Li, Z.; Dai, J.; Zhang, D. y Xiu, Z. (2009). Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths using an ethanol/phosphate system. *Process Biochemistry*, 44: 112-117.
- Juni, E. (1952).** Mechanisms of formation of acetoin by bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 195(2): 715-726.
- Jurchescu, I.;** Hamann, J.; Zhou, X.; Ortmann, T.; Kuenz, A.; Prüsse, U.; Lang, S. (2013). Enhanced 2,3-butanediol production in fed-batch cultures of free and immobilized *Bacillus licheniformis* DSM 8785. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 6715-6723.
- Kudrewizki, F. y Rabe, P. (1986).** Model of the dissipation of mechanical energy in gassed stirred tanks. *Chemical Engineering Science*, 41: 2247-2252.
- Lee, S.;** Kim, B.; Yang, J.; Jeong, D.; Park, S. y Lee, J. (2015). A non-pathogenic and optically high concentrated (R,R)-2,3-butanediol biosynthesizing *Klebsiella* strain. *Journal of Biotechnology*, 209: 7-13.
- Li, Z.;** Jian, J.; Wei, X.; Shen, X. y Chen, G. (2010). Microbial production of meso-2,3-butanediol by metabolically engineered *Escherichia coli* under low oxygen condition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 2001-2009.

Li, Y.; Zhu, J.; Wu, Y. y Liu, J. **(2013)**. Reactive-extraction of 2,3-butanediol from fermentative broth by propionaldehyde: equilibrium and kinetic study. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 30 (1): 73-81.

Li, L.; Li, K.; Wang, Y.; Chen. C.; Xu, Y.; Zhang, L.; Han, B.; Gao, C.; Tao, F.; Ma, C. Y Xu, P. **(2015)**. Metabolic engineering of *Enterobacter cloacae* for high-yield production of enantiopure (2R,3R)-2,3-butanediol from lignocellulose-derived sugar. *Metabolic Engineering*, 28: 19-27.

Ma, C.; Wang, A.; Qin, J.; Li, L.; Ai, X.; Jiang, T.; Tang, H. y Xu, P. **(2009)**. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82: 49-57.

Magee, R. J. y Kosaric, N. (1987). The microbial production of 2,3-butanediol. *Advances in Applied Microbiology*, 32: 89-161.

Martinez, I. (2013). Biodesulfuración de dibenzotiofeno con *Pseudomonas putida* KTH2: una aproximación al cambio de escala del proceso. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Nakashimada, Y.; Kanai, K. y Nishio, N. **(1998)**. Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2,3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. *Biotechnology Letters*, 20(12): 1133-1138.

Olmos, E; Mehmood, N; Haj Husein, L.; Goergen, J.; Fick, M. y Delaunay, S., **(2013)**. Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 36: 259-272.

Palomares, L. A.; Lopez, S. y Ramirez, O. **(2004)**. Utilization of oxygen uptake rate to assess the role of glucose and glutamine in the metabolism of infected insect cells cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 19: 87-93.

Park, C.; Lu, M.; Yun, S.; Park, K. y Lee, J. **(2013)**. Effect of pH on the metabolic flux of *Klebsiella oxytoca* producing 2,3-butanediol in continuous cultures at different dilution rates. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36: 845 – 855.

Perego, P.; Converti, A.; Del Borghi, A. y Canepa, P. **(2000)**. 2,3-butanediol production by *Enterobacteria erogenes*: selection of the optimal conditions and application to food industry residues. *Bioprocess Engineering*, 23: 613-620.

Petrov, K. y Petrova, P. (2009). High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Biotechnological Products and Process engineering*, 84: 659 – 665.

Petrov, K. y Petrova, P. (2010). Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 943-949.

Pirt, S. J. y Callow, D. S. (1958). Extracellular product formation by microorganism in continuous culture. Production of 2,3-butanediol by *Aerobacter aerogenes* in a single stage process. *Journal of Applied Bacteriology*, 21 (2): 188-205.

Rowe, G. E.; Margaritis, A. y Wei, N. (2003). Specific oxygen uptake rate variations during batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* HD-1. *Biotechnology Progress*, 19(5): 1439-1443.

Santos, V. E.; Alcon, A.; Galdeano, C.; Gomez, E. y Garcia-Ochoa, F. (2006). Oxygen uptake rate measurements both by the dynamic method and during the process growth of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8: Modelling and difference in results. *Biochemical Engineering Journal* 32, 198-204.

Savakis, P. E.; Angermayr, S. A. y Hellingwerf, K. J. (2013). Synthesis of 2,3-butanediol by *Synechocystis* PCC6803 via heterologous expression of catabolic pathway from lactic acid- and enterobacteria. *Metabolic Engineering*, 20: 121-130.

Snoep, J. L.; Teixeira, M. J.; Starrenburg, M. J. C. y Hugenholtz, J. (1992). Isolation, characterization, and physiological role of pyruvate dehydrogenase complex and α -acetolactate synthetase of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* bv. *diacetylactis*. *Journal of Bacteriology*, 174(14): 4838-4841.

Sun, L.; Wang, X.; Dai, J. y Xiu, Z. (2009). Microbial production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82: 847-852.

Tan, Y.; Liu, Z.; Liu, Z. y Li, F. (2015). Characterization of an acetoin reductase/2,3-butanediol dehydrogenase from *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528. *Enzyme and Microbial Technology*, 79-80: 1-7.

Tsvetanova, F.; Petrova, P. y Petrov, K. (2014). 2,3-butanediol production from starch by engineered *Klebsiella pneumoniae* G31-A. *Biotechnological products and process engineering*, 98: 2441-2451.

Tsau, J.; Guffanti, A. A. y Montville, T. J. (1992). Conversion of pyruvate to acetoin helps to maintain pH homeostasis in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3): 891-894).

Van't Riet, K., (1983). Mass transfer in fermentation. *Trends in Biotechnology*, 1: 113–119.

Vivijs, B; Moons, P.; Geeraerd, A.; Aertsen, A. y Michiels, C.W. (2014). 2,3-butanediol fermentarion promotes growth of *Serratia plymuthica* at low pH but not survival of extreme acid challenge. *International Journal of Food Microbiology*, 175: 36 – 44.

Voloch, M.; Jansen, N. B.; Ladisch, M. R.; Tsao, G. T.;Narayan, R. y Rodwell, V. W. (1985). 2,3-butanediol. En: Moo-Young, M.; Cooney, C. L. y Humphrey, A. E. Comprehesive Biotechnology: The principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. Ed. Oxford: Pergamon/Elsevier. Nueva York, pp. 933- 947.

Wang, Y.; Teng, H. y Xiu, Z. (2011). Effect of aeration strategy on the metabolic flux of *Klebsiella pneumoniae* producing 1,3-propanediol in continuous cultures at different glycerol concentrations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38: 705-715.

Wong, C.; Yen, H.; Lin, C. y Chang, J. (2014). Effects of pH and fermentation strategies on 2,3-butanediol production with an isolated *Klebsiella* sp. Zmd30 strain. *Bioresource Technology* , 152: 169 – 176.

Xiu, Z. y Zeng, A. (2009). Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78: 917-926.

Yang, T.; Rao, Z.; Zhang, X.; Xu, M.; Xu, Z. y Yang, S. (2013). Fermentation of biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*: effects of co-substrates on 2,3-butanediol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 7651-7658.

Yang, T.; Rathnasingh, C.; Lee, H. J. y Seung, D. (2014). Identification of acetoin reductases involved in 2,3-butanediol pathway in *Klebsiella oxytoca*. *Journal of Biotechnology*, 172: 59-66.

Yang, T.; Rao, Z.; Hu, G.; Zhang, X.; Liu, M.; Dai.; Y.; Xu, M.; Xu, Z. y Yang, S. (2015a). Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for redistributing the carbon flux to 2,3-butanediol by manipulating NADH levels. *Biotechnology for biofuels*, 8: 129-138.

Yang, T.; Rao, Z.; Zhang, X.; Xu, M.; Xu, Z. y Yang, S. **(2015b)**. Enhanced 2,3-butanediol production from biodiesel-derived by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbial cell factories*, 14: 122-133.

Yen, H.; Li, F. y Chang, J. **(2014)**. The effects of dissolved oxygen level on the distribution of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol produced from glycerol by an isolated indigenous *Klebsiella* sp. Ana-WS5. *Bioresource Technology*, 153: 374-378.

Yu, E. K. C. y Saddler, J. N. (1983). Fed-batch approach to production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* growth on high substrate concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(3): 630-635.

Zeng, A.; Blieb, H. y Deckwer, W. **(1990a)**. Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33: 485-489.

Zeng, A.; Blieb, H. y Deckwer, W. **(1990b)**. 2,3-butanediol production by *Enterobacter aerogenes* in continuous culture: role of oxygen supply. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(3): 264-268.

Zhang, X.; Bao, T.; Rao, Z.; Yang, T.; Xu, Z.; Yang, S. y Li, H. **(2014)**. Two-stage pH control strategies based on the pH preference of acetoin reductase regulates acetoin and 2,3-butanediol distribution in *Bacillus subtilis*. *Plos One*, 9(3): 1-9.

Zujlan, F. A.; Repizo, G. D.; Alarcon, S. H. y Magni, C. **(2014)**. α -Acetolactate synthetase of *Lactococcus lactis* contributes to pH homeostasis in acid stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 188: 99-107.

CAPÍTULO 5

***PRODUCCIÓN DE 2,3-BUTANODIOL
CON CÉLULAS EN ESTADO DE RESTING CELLS***

Las biotransformaciones catalizadas por células completas pueden tener lugar durante el crecimiento de estas o bien cuando las células se encuentran en estado de reposo, también denominado *resting cells*. Un biocatalizador en estado de *resting cells* no experimenta crecimiento celular durante la biotransformación, sin embargo, las células que lo constituyen se encuentran activas en términos metabólicos. Esto es posible mediante la separación de la etapa de crecimiento del biocatalizador y la de biotransformación o producción del metabolito de interés. El biocatalizador obtenido durante la etapa de crecimiento es separado por filtración o centrifugación del caldo de cultivo y es empleado en la etapa posterior de biotransformación. Generalmente, el medio de esta segunda etapa consiste en una disolución tampón, que permite el mantenimiento de las condiciones de presión osmótica y pH en un rango adecuado para asegurar la integridad celular. El medio también contiene el o los compuestos que actúen como sustrato de la biotransformación. Sin embargo, carece de los nutrientes esenciales y, por tanto, el crecimiento celular está impedido. De esta forma, el objetivo último de una operación catalizada por células en estado de *resting cells* es dirigir el metabolismo hacia el producto de interés minimizando la pérdida de rendimiento por las desviaciones hacia la producción de biomasa u otros metabolitos secundarios.

Dentro de las ventajas de llevar a cabo una operación con un biocatalizador compuesto por células en estado de *resting cells* destacan las siguientes:

- Las etapas de crecimiento y producción pueden ser optimizadas de manera individual, evitando además los fenómenos de inhibición por sustrato y producto asociados al crecimiento celular.
- La concentración celular puede ser determinada fácilmente para alcanzar la velocidad de conversión óptima del proceso de interés.
- La etapa de producción se puede llevar a cabo en condiciones no estériles.
- Las operaciones *downstream* de aislamiento y purificación del producto son más sencillas, ya que la composición final del medio también lo es, debido a la minimización de los subproductos a través de la focalización del metabolismo celular hacia el producto de interés

Teniendo en cuenta las ventajas anteriormente citadas, el objeto del presente capítulo es evaluar la posibilidad de emplear un biocatalizador compuesto por células en estado de *resting cells* para el proceso de producción de 2,3-BD. Si bien la novedad de este campo de investigación se refleja en la escasez de número de trabajos previos publicados empleando células en crecimiento, la posibilidad de emplear un biocatalizador en estado de *resting cells* en el mismo es completamente innovadora, no habiéndose hallado ningún estudio pretérito al respecto.

En lo referente a procesos similares, tras una búsqueda bibliográfica exhaustiva, únicamente se encontró una investigación precedente enfocada a la producción de 2,3-BD empleando células en estado de *resting cells* de *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus subtilis* con glucosa como fuente de carbono (Liu y col., 2011). Asimismo, cabe destacar que son diversos los trabajos publicados que se centran en la revalorización de la glicerina empleando biocatalizadores en estado de *resting cells* para producir distintos compuestos de interés. En la Tabla 5.1 se han recopilado algunos de los más recientes, que incluye la información sobre el microorganismo empleado y el producto de interés en cada una de las investigaciones.

Este escenario apunta favorablemente la posibilidad de desarrollar una operación empleando un biocatalizador en *resting cells* para el proceso de producción de 2,3-BD a partir de glicerina. En este Capítulo se abordará el estudio de las variables determinantes del proceso: estudio de la etapa previa de crecimiento del biocatalizador e influencia de las condiciones de operación en la etapa de producción (concentración del biocatalizador, pH, velocidad de agitación y concentración glicerina empleada), así como la viabilidad del proceso empleando glicerol crudo. Por último, se compararán los resultados de este Capítulo con los obtenidos en el Capítulo 4, en el que se ha abordado el desarrollo del proceso empleando células en

crecimiento, para evaluar la aplicabilidad y limitaciones de cada una de las formas de operación planteadas en la presente Memoria para la producción de 2,3-BD.

Tabla 5.1 Revisión bibliográfica de los microorganismos empleados y el producto de interés empleando células en estado de resting cells para procesos de revalorización de glicerina.

MICROORGANISMO	PRODUCTO DE INTERÉS	AUTORES
<i>Candida magnoliae</i>	Manitol	Khan y col., 2009
<i>Klebsiella sp.</i>	1,3-propanodiol	Wong y col., 2011
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ácido 3-hidroxipropiónico 1,3-propanodiol	Zhao y col., 2009 Kumar y col., 2013
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ácido 3-hidroxipropiónico	Ramakrisnan y col., 2015
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Dihidroxiacetona	Hu y col., 2011 Lidia y Stanislaw, 2012

5.1 DESARROLLO DE LA ETAPA DE OBTENCIÓN DEL BIOCATALIZADOR

La optimización de la etapa de obtención del biocatalizador es determinante en el éxito de la posterior etapa de producción con células en estado de *resting cells*. El crecimiento del microorganismo debe llevarse a cabo en aquellas condiciones de operación que favorezcan el desarrollo de la maquinaria enzimática requerida en las rutas metabólicas implicadas en el proceso de biotransformación posterior. En el presente Apartado se va a llevar a cabo la selección de las condiciones de crecimiento del biocatalizador así como la evaluación de la posibilidad de almacenamiento del mismo antes de su empleo en la etapa de producción.

5.1.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DEL BIOCATALIZADOR

Para el desarrollo de un protocolo estandarizado de obtención de un biocatalizador eficaz para el proceso de producción de 2,3-BD a partir de glicerol, empleando células en estado de *resting cells*, ha sido clave tanto la consolidada experiencia del Grupo de Investigación *Físico-Química de los Procesos Industriales y Medioambientales* de la Universidad Complutense de Madrid en el desarrollo de otros bioprocesos con biocatalizadores de esta naturaleza (Martin y col., 2005; Calzada y col., 2011; Gomez y col., 2015; Martinez y col., 2016) así como el conocimiento del proceso adquirido en los Capítulos anteriores.

En la Figura 5.1 se muestra un esquema de las etapas del proceso de producción del biocatalizador en *resting cells*.

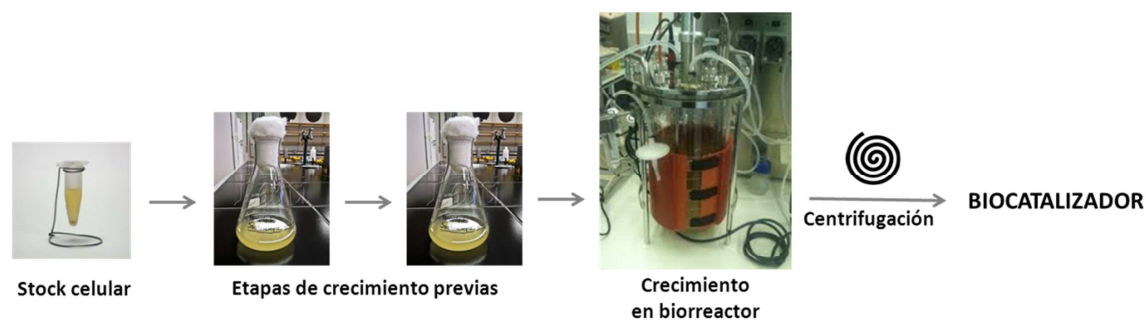


Figura 5.1 Esquema de las etapas del proceso de producción del biocatalizador para la operación en resting cells.

Si bien el protocolo estandarizado constituido por dos crecimientos sucesivos de los inóculos es necesario para conseguir una masa celular homogénea, el crecimiento posterior en fermentador permite, mediante el control de las condiciones de operación en sus valores óptimos, la obtención de células metabólicamente activas para el proceso de interés. Las variables más influyentes en el proceso son el pH y la disponibilidad de oxígeno, tal y como se extrae de la comprensión del sistema abordada en el Capítulo 4. Por ello, se ha considerado determinante estudiar ambas variables en el presente Epígrafe. En relación al pH, se ha considerado conveniente aplicar la estrategia descrita en el Apartado 4.2.3 en esta etapa de obtención del biocatalizador: el crecimiento comienza en pH neutro, desciende a lo largo de la fermentación y posteriormente control a 5,5 cuando éste ha descendido naturalmente a dicho valor como consecuencia de la producción de algunos ácidos orgánicos.

En el caso de la velocidad de agitación, que determina la disponibilidad de oxígeno en cada caso, es necesario encontrar qué condiciones conducen a la obtención de la biomasa más activa. En la Tabla 5.2 se muestra la planificación experimental planteada para la optimización de la etapa de obtención del biocatalizador, que comprende velocidades de agitación entre 100 y 625 rpm. Los resultados de dichos experimentos se adjuntan en la Tabla III.1 del Anexo III, donde se incluyen las evoluciones con el tiempo de biomasa, glicerina, 2,3-BD y otros metabolitos.

El objetivo perseguido en la etapa de producción del biocatalizador es conseguir una masa celular metabólicamente activa para la posterior etapa de biotransformación. Para determinar qué condiciones de velocidad de agitación conduce al biocatalizador más apropiado se han establecido los siguientes criterios de comparación:

- La **concentración de 2,3-BD específica** ($C_{2,3-BD}^{esp}$), que relaciona la concentración máxima de 2,3-BD alcanzada con la concentración celular que ha llevado a cabo dicha producción, según se muestra en la ecuación [5.1].

$$C_{2,3-BD}^{esp} \left(g_{2,3-BD} / g_X \right) = C_{2,3-BD}^{m\acute{a}x} / C_X \quad [5.1]$$

- La **productividad de 2,3-BD específica** ($P_{2,3-BD}^{esp}$), que relaciona la concentración máxima de 2,3-BD alcanzada al tiempo t que la concentración celular C_X ha tardado en producirla, mostrada en la ecuación [5.2].

$$P_{2,3-BD}^{esp} \left(g_{2,3-BD} / g_X \cdot h \right) = C_{2,3-BD}^{m\acute{a}x} / (C_X \cdot t) \quad [5.2]$$

En la Figura 5.2 (A) se ha representado la influencia de la velocidad de agitación en la concentración específica de 2,3-BD. Se observa que existe una plataforma entre las velocidades de agitación 100 y 250 rpm que conducen a una concentración de 2,3-BD específica máxima. Para velocidades de agitación superiores, este parámetro experimenta una caída brusca, hasta alcanzar valores cercanos a cero en las velocidades de agitación superiores (550 y 625 rpm).

En la Figura 5.2 (B) se ha presentado la productividad específica frente a la velocidad de agitación. La tendencia observada para este parámetro es ligeramente diferente. Se alcanza un máximo de productividad específica para la velocidad de agitación 250 rpm. A partir de este valor, la productividad específica decrece bruscamente hasta llegar a valores cercanos a cero en las velocidades de agitación superiores.

Tabla 5.2 Planificación experimental realizada para la optimización de la etapa de obtención del biocatalizador en biorreactor tipo tanque agitado. Condiciones: $T(^{\circ}C) = 30$; medio de cultivo 2; $C_G (g/L) = 30$; $Q_{aire} (vvm) = 1,5$; $pH_0 = 7,0$; Evolución libre de pH y posterior control a pH 5,5.

EXPERIMENTO	N (rpm)
N1	100
N2	175
N3	250
N4	325
N5	400
N6	475
N7	550
N8	625

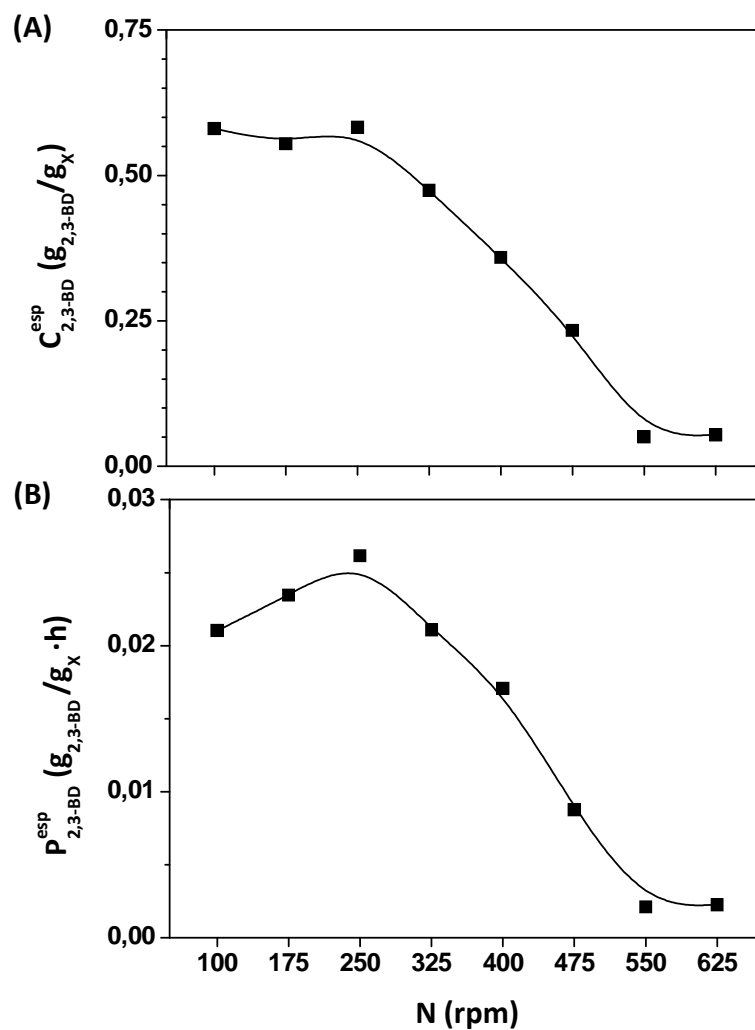


Figura 5.2 Influencia de la velocidad de agitación en la **(A)** concentración específica de 2,3-BD alcanzada y **(B)** la productividad específica de 2,3-BD alcanzada.

A la vista de los resultados anteriormente expuestos, se concluye que la velocidad de agitación óptima que conduce a la obtención de un biocatalizador potencialmente más efectivo es 250 rpm. Por tanto, las condiciones de operación de la etapa de crecimiento quedan fijadas en los siguientes valores:

- Velocidad de agitación: 250 rpm.
- Caudal de aireación: 1,5 vvm.
- Concentración inicial de glicerina: 30 g/L.
- Medio de cultivo: 2.
- pH inicial: 7,0; Posterior control a pH 5,5.
- Tiempo de crecimiento: 20 h.

5.1.2 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DEL BIOCATALIZADOR

Debido a la complejidad experimental de las múltiples etapas de obtención del biocatalizador y con el objetivo de evaluar las limitaciones de la operación a escala industrial, se realizó un estudio de la influencia del tiempo de almacenamiento del biocatalizador. Para alcanzar este fin, se estudió el proceso de producción de 2,3-BD empleando como biocatalizador células en estado de *resting cells* que han sido directamente empleadas después de haber sido obtenidas (según el procedimiento experimental anteriormente descrito), lo que corresponde a un control positivo o referencia con 0 días de tiempo de almacenamiento a comparar con células que han sido 1, 2 y 3 días almacenadas a 4 °C, respectivamente. El medio de conservación corresponde a la disolución tampón fosfato (50 mM) en suero salino [NaCl 9% (p/p)]. La planificación experimental realizada se muestra en la Tabla 5.3 y los resultados experimentales obtenidos en el análisis de la composición del caldo de cultivo al finalizar el experimento se recogen en la Tabla III.2 del Anexo III.

Tabla 5.3 Planificación experimental realizada para el estudio de la influencia del tiempo de almacenamiento del biocatalizador. Condiciones: Reactor: matraz Erlenmeyer 250 mL; Volumen de trabajo (mL): 50; T (°C) = 30; N (rpm) = 200; Tampón: Fosfato 50 mM; C_x (g/L) = 12; C_G (g/L) = 30.

EXPERIMENTO	$t_{\text{almacenamiento}}$ (d)
D0	0
D1	1
D2	2
D3	3

Como criterio de comparación se ha considerado el rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico. En la Figura 5.3 se ha representado la influencia del tiempo de almacenamiento del biocatalizador en el rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico observado tras 24 horas de su empleo. Como puede observarse en dicha Figura, no existen diferencias significativas entre el empleo directo del biocatalizador (0 días de almacenamiento) y el almacenamiento de éste durante 1 día. Sin embargo, la actividad del mismo comienza a decrecer en los días posteriores. Por tanto, se concluye que las células de *R. terrigena* cuando son empleadas como biocatalizador en estado de *resting cells*, deben ser almacenadas como máximo durante 1 día en las condiciones empleadas para que conserven su efectividad en el proceso de transformación de glicerina a 2,3-BD.

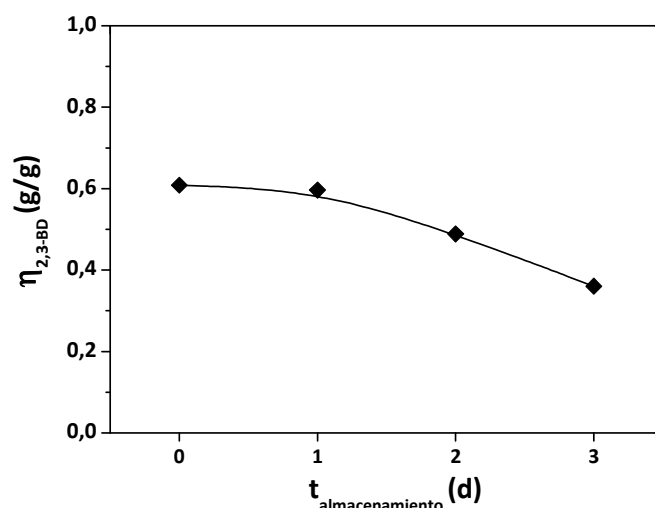


Figura 5.3 Influencia del tiempo de almacenamiento del biocatalizador en el rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico.

5.2 OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE BIOTRANSFORMACIÓN

En este Apartado se va a estudiar la influencia de las condiciones de operación en el proceso de biotransformación de la glicerina para la producción de 2,3-BD empleando el biocatalizador constituido por células en estado de *resting cells*, obtenidas por el protocolo descrito en el Apartado anterior.

5.2.1 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL pH

Para comenzar a abordar la optimización de las condiciones de operación en la biotransformación empleando células en estado de *resting cells* se consideró un buen punto de partida el estudio de la influencia del pH, debido a la profunda influencia de esta variable en el proceso. Para ello, se planteó una planificación experimental en torno al empleo de diferentes disoluciones tampón (citrato, fosfato y TRIS), con el objetivo de mantener el pH en distintos intervalos, y barriendo un rango de fortalezas para cada uno entre 25 y 100 mM. Además también fue probado tampón acetato en el mismo intervalo de concentraciones, con resultados negativos en todos los ensayos, por lo que no se incluyen en esta Memoria.

En la Tabla 5.4 se recoge la planificación experimental planteada en este Apartado. Los resultados de este bloque experimental (evolución del pH, consumo de sustrato y producción de metabolitos) se recogen en la Tabla III.3 del Anexo III.

Tabla 5.4 Planificación experimental realizada para el estudio de la influencia del pH. Condiciones: Reactor: matraz Erlenmeyer 250 mL; Volumen de trabajo (mL): 50; $T (^{\circ}\text{C}) = 30$; $N (\text{rpm}) = 200$; $C_x (\text{g/L}) = 12$; $C_G (\text{g/L}) = 30$.

EXPERIMENTO	Tampón (pH)	Fortaleza (mM)
C1	Citrato (4,8)	25
C2		50
C3		75
C4		100
F1	Fosfato (7,0)	25
F2		50
F3		75
F4		100
T1	TRIS (8,0)	25
T2		50
T3		75
T4		100

Para evaluar la influencia del tampón empleado, se han establecido como criterio de comparación el rendimiento de 2,3-BD respecto del máximo teórico y la conversión del sustrato así como la variación de pH experimentada por el medio al comienzo y final del experimento, para poder extraer las conclusiones pertinentes sobre la influencia de esta variable. En las Figuras 5.4, 5.5 y 5.5 se ha representado la influencia de la concentración de los tampones estudiados: citrato, fosfato y TRIS, respectivamente.

Respecto al uso de tampón citrato, puede observarse en la Figura 5.4 que el empleo de la menor de las concentraciones probadas conduce a bajos valores de rendimiento de 2,3-BD y conversión de glicerina, como consecuencia de la bajada de pH por debajo de 4,5. Este fenómeno es debido a que la fortaleza 25 mM no consigue amortiguar la bajada de pH y, por tanto, se observa un efecto de inhibición del proceso debido a la acidez del medio alcanzada. A partir de ese valor, no se registra bajada del pH respecto al pH del tampón al finalizar el experimento, lo que conduce a valores más elevados de rendimiento y conversión, alcanzando, para las fortalezas de 75 y 100 mM, valores cercanos a 0,50 y 0,80, respectivamente.

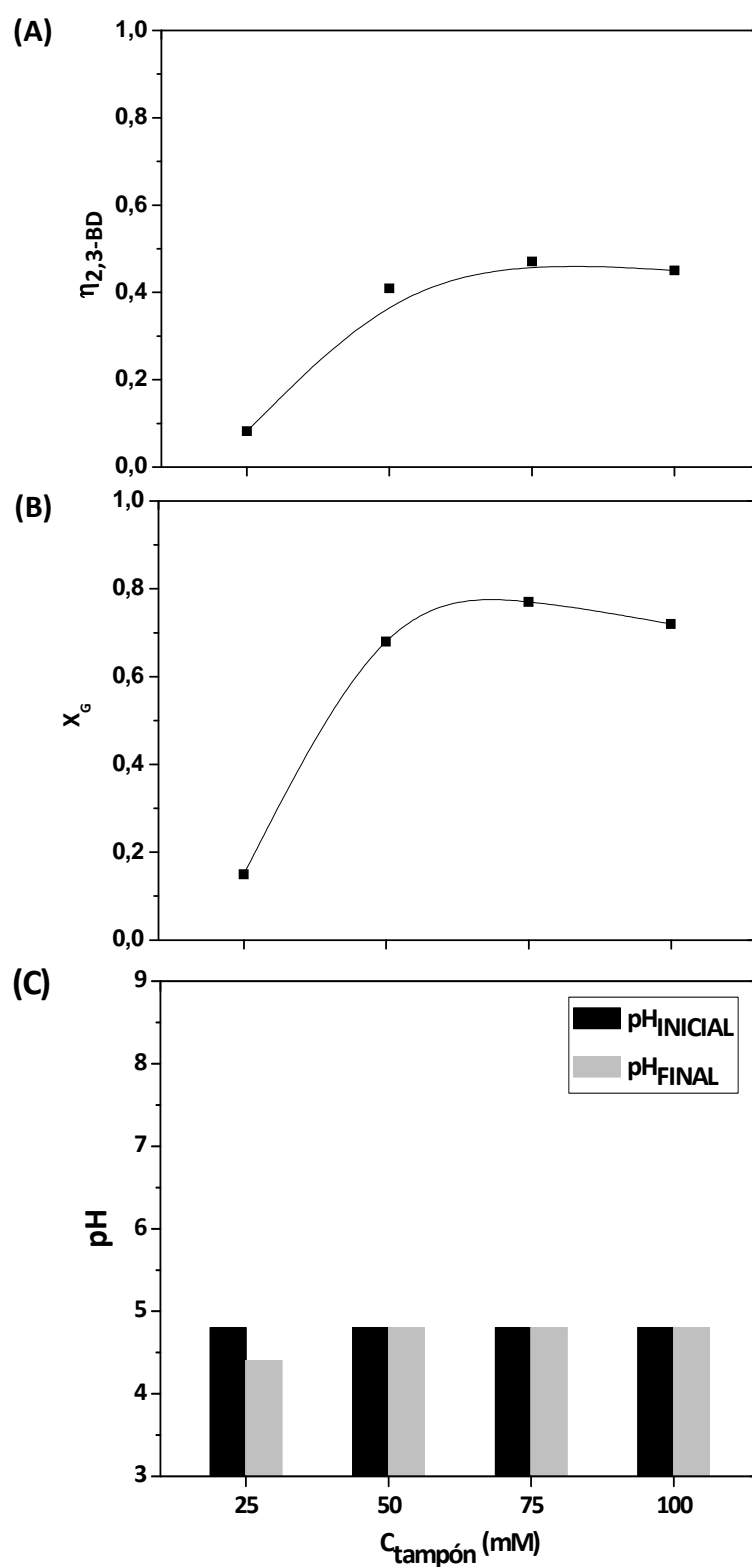


Figura 5.4 Influencia de la concentración del tampón citrato en **(A)** el rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico, **(B)** la conversión de glicerol y **(C)** la variación del pH.

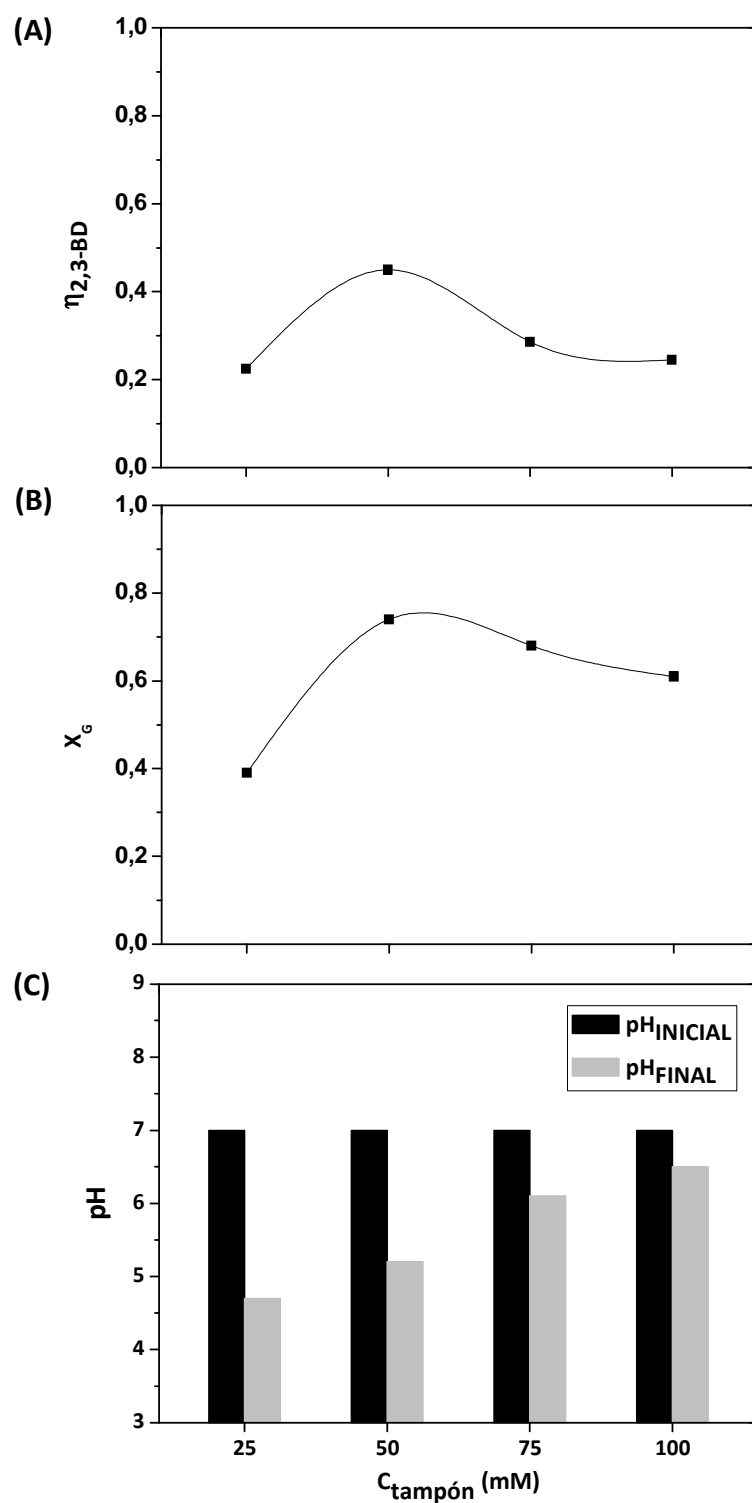


Figura 5.5 Influencia de la concentración del tampón fosfato en **(A)** el rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico, **(B)** la conversión de glicerol y **(C)** la variación del pH.

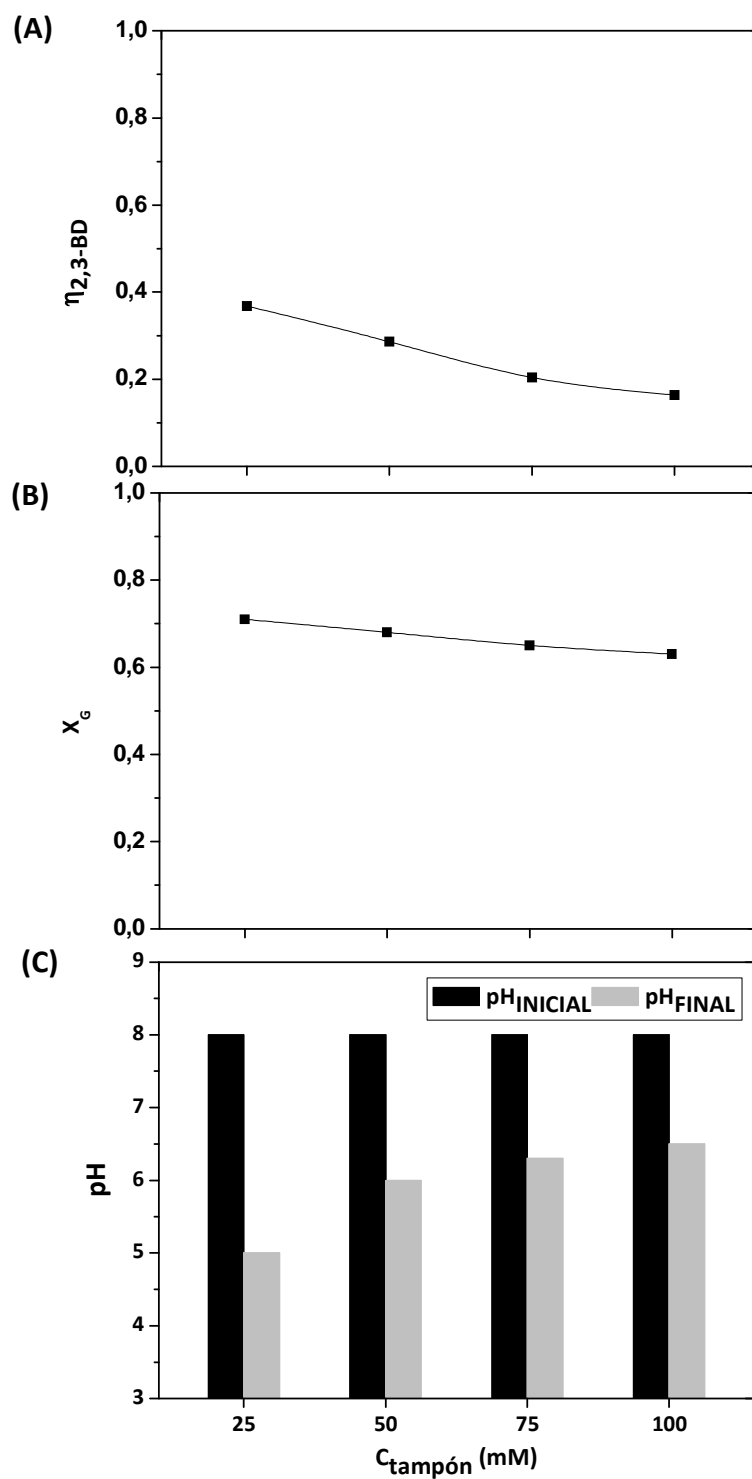


Figura 5.6 Influencia de la concentración del tampón TRIS en **(A)** el rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico, **(B)** la conversión de glicerol y **(C)** la variación del pH.

En la Figura 5.5, se muestran los resultados relativos al empleo de tampón fosfato. En este caso no se consigue la amortiguación del pH en valores neutros en ninguno de los casos, si bien es destacable que el rendimiento y la conversión alcanzan un máximo para la fortaleza 50 mM. En este punto, los valores de rendimiento respecto al máximo teórico y conversión son similares a los obtenidos con tampón citrato (0,50 y 0,80). En este caso el intervalo de pH durante el experimento se encuentra entre 7 y 5,2.

En la Figura 5.6 se muestran los resultados obtenidos para los experimentos realizados con tampón TRIS. En este caso, la tendencia observada para ambas variables (rendimiento y conversión) es decreciente cuanto mayor es la fortaleza de la disolución amortiguadora, debido a que el intervalo de pH en el que transcurre la operación es cada vez menos ácido. Los mejores valores obtenidos, cuando la concentración del tampón es 25 mM, el rendimiento respecto al máximo teórico es de 0,38 y la conversión está en torno a 0,70. Estos valores son inferiores a los resultados obtenidos para los otros dos tampones en estudio.

Con lo anteriormente descrito, se puede concluir que la producción de 2,3-BD empleando células en estado de *resting cells* se encuentra favorecida por pH ácidos, tendencia análoga a la observada cuando se emplean células en crecimiento. Asimismo, valores de pH excesivamente ácidos (por debajo de 4,5) tienen un efecto inhibitorio de la ruta metabólica de interés. Si bien tanto tampón citrato en concentraciones 75 y 100 mM y tampón fosfato en concentración 50 mM conducen a los mismos resultados en términos de rendimiento de 2,3-BD y conversión de glicerol, se considera más apropiado el empleo de tampón fosfato. Esta decisión tiene su base atendiendo a la composición de la glicerina cruda residuo del proceso de producción de biodiésel, que presenta en su composición gran cantidad de sales de fosfato. Por tanto, se prevé la realización de la operación de conversión de glicerina a 2,3-BD con células en estado de *resting cells* empleando dicha fuente de carbono sin necesidad de adicionar ningún tipo de tampón al medio, únicamente aprovechando las impurezas de la misma.

5.2.2 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOCATALIZADOR

Si no existen limitaciones al transporte de materia, la velocidad de la reacción química controla la velocidad global del proceso de biotransformación y ésta está relacionada con la concentración de biocatalizador empleada. En este Apartado se va a evaluar la influencia de la concentración de biocatalizador en el proceso de producción de 2,3-BD. El rango de concentraciones estudiadas está entre 5 y 25 g/L, como muestra la Tabla 5.5. Los resultados

obtenidos para cada una de las concentraciones estudiadas se han recogido en la Tabla III.4 del Anexo III.

Tabla 5.5 Planificación experimental realizada para el estudio de la influencia de la concentración de biocatalizador empleado. Condiciones: Reactor: matraz Erlenmeyer 250 mL; Volumen de trabajo (mL): 50; $T (^{\circ}\text{C}) = 30$; $N (\text{rpm}) = 200$; Tampón: Fosfato 50 mM; $C_G (\text{g/L}) = 30$.

EXPERIMENTO	$C_x (\text{g/L})$
X1	5
X2	10
X3	15
X4	20
X5	25

En la Figura 5.7 se ha representado la influencia de la concentración de biocatalizador en la conversión de glicerol, el rendimiento y la productividad de 2,3-BD. Como puede observarse en la citada Figura, la dependencia de estos parámetros con la concentración de biocatalizador sigue una tendencia sigmoideal. A baja concentración de biocatalizador (5 g/L), el valor del rendimiento y la productividad son muy cercanos a cero y la conversión de glicerol está en torno a 0,10. Sin embargo, a medida que la concentración de biocatalizador empleado es mayor, todos los parámetros estudiados aumentan. El empleo de una concentración de 25 g/L de biocatalizador apenas mejora los resultados respecto a la concentración anterior, 20 g/L, consiguiéndose en ambos casos el consumo total del sustrato carbonado y un rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico en torno a 0,6 y una productividad de 0,6 g/(L·h). A la vista de estos resultados, se concluye que la concentración de biocatalizador óptima para la biotransformación en las condiciones estudiadas es 20 g/L, que será empleada en los estudios sucesivos.

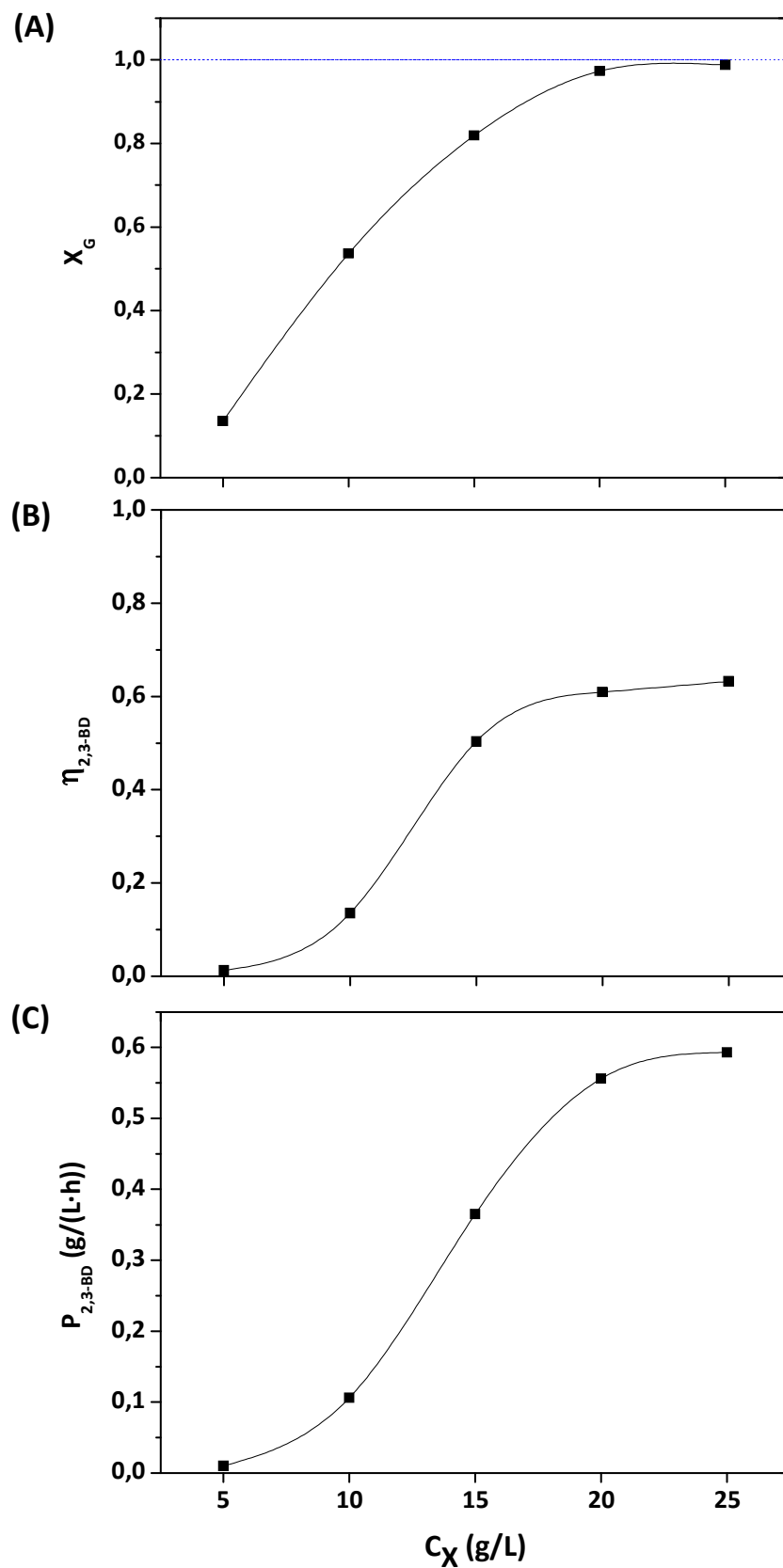


Figura 5.7 Influencia de la concentración de biocatalizador en (A) la conversión de glicerina, (B) el rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico y (C) la productividad de 2,3-BD.

5.2.3 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES HIDRODINÁMICAS

Como se ha comprobado en el Capítulo anterior, las condiciones hidrodinámicas a las que está sometido el cultivo son de gran influencia para la producción de 2,3-BD, debido a que determinan el grado de mezcla del caldo de cultivo, la disponibilidad de oxígeno en el mismo así como los fenómenos de estrés hidrodinámico y oxidativo que pueden llegar a sufrir las células. Por tanto, para la optimización del proceso empleando células en estado de *resting cells* es necesario llevar a cabo un estudio de la influencia de las condiciones hidrodinámicas, análogo al desarrollado empleando células en crecimiento.

Los estudios expuestos en los apartados anteriores han sido realizados en matraz *Erlenmeyer*. Para el estudio de la influencia de las condiciones hidrodinámicas es necesario el seguimiento de la concentración de oxígeno disuelto en el caldo así como la predicción teórica del coeficiente de transferencia de materia. Por ello, en el presente Apartado se empleó como dispositivo experimental un biorreactor comercial de 1 L de volumen, cuyo volumen de trabajo fue de 400 mL. Este dispositivo permite el control externo de pH, que se fijó en 5,5 debido a las conclusiones extraídas en el estudio de la influencia de pH.

Las variables de operación que determinan las condiciones hidrodinámicas en el interior del tanque son la velocidad de agitación, el caudal y la composición del gas de entrada. De manera análoga al caso del proceso catalizado por células en crecimiento, en el estudio de las condiciones hidrodinámicas se va a considerar únicamente la variación de la velocidad de agitación. En la Tabla 5.6 se incluye la planificación experimental realizada en este bloque, que comprende experimentos realizados a velocidades de agitación entre 200 y 500 rpm. Asimismo, en la Tabla III.5 del Anexo III se hallan los resultados experimentales referentes a este bloque.

Tabla 5.6 Planificación experimental realizada para el estudio de las condiciones hidrodinámicas. Condiciones: Reactor: biorreactor 1L; Volumen de trabajo (mL): 400; C_X (g/L) = 20 g/L; T (°C) = 30; Q_{AIRE} (vvm) = 1,5; Tampón: Fosfato 50 mM; pH control 5,5 (HCl 2M; NaOH 2M); C_G (g/L) = 45.

EXPERIMENTO	N (rpm)
M1	200
M2	300
M3	400
M4	500

En la Figura 5.8 se muestra la evolución de las concentraciones de glicerol, 2,3-BD, ácido láctico y etanol. Tanto el consumo de sustrato como la producción de los metabolitos están estrechamente ligados a la velocidad de agitación. En relación al consumo de la fuente carbonada, a mayor velocidad de agitación, mayor es la velocidad de consumo de glicerol experimentada, en el intervalo de agitaciones comprendido entre 200 y 400 rpm. Para la mayor de estas velocidades, se alcanza el consumo total de glicerol en 30 h. Cuando se emplea 500 rpm como velocidad de agitación, la velocidad de consumo de sustrato en las primeras horas de experimentación es mayor que la registrada en el resto de ensayos. Sin embargo, a partir de las 5 h, se observa una ralentización significativa del proceso y prácticamente una detención del mismo a partir de las 20 h.

La tendencia observada en la evolución de la concentración de 2,3-BD es análoga a la descrita para el sustrato: tanto la velocidad como la concentración final alcanzada es mayor cuanto mayor es la velocidad de agitación empleada en el rango de 200 a 400 rpm, siendo la concentración de 2,3-BD final alcanzada es 7,1, 14,6 y 20,0 g/L, respectivamente. Para la mayor agitación, 500 rpm, se observa una velocidad inicial mayor que en los casos anteriores. Sin embargo, la producción se detiene con la parada de consumo del sustrato, alcanzando una concentración alrededor de 5 g/L.

En el caso de la producción de ácido láctico, el aumento de velocidad de agitación no repercute en la concentración alcanzada, sino que esta concentración es máxima cuando la velocidad empleada es 300 rpm. Para valores inferiores o superiores, la concentración de ácido láctico en el caldo de cultivo es menor. Cabe destacar que, para las velocidades de agitación superiores (400 y 500 rpm), la producción de ácido láctico presenta un máximo, siendo empleado este metabolito como sustrato por la célula a partir de ese momento, tendencia análoga a la observada cuando las células se encontraban en estado de crecimiento.

Por último, la tendencia observada para el etanol es similar a la anteriormente descrita para el ácido láctico. En las velocidades de agitación superiores (400 y 500 rpm) se produce la reabsorción de este compuesto, consumiéndose totalmente en el experimento realizado a la mayor de las velocidades de agitación.

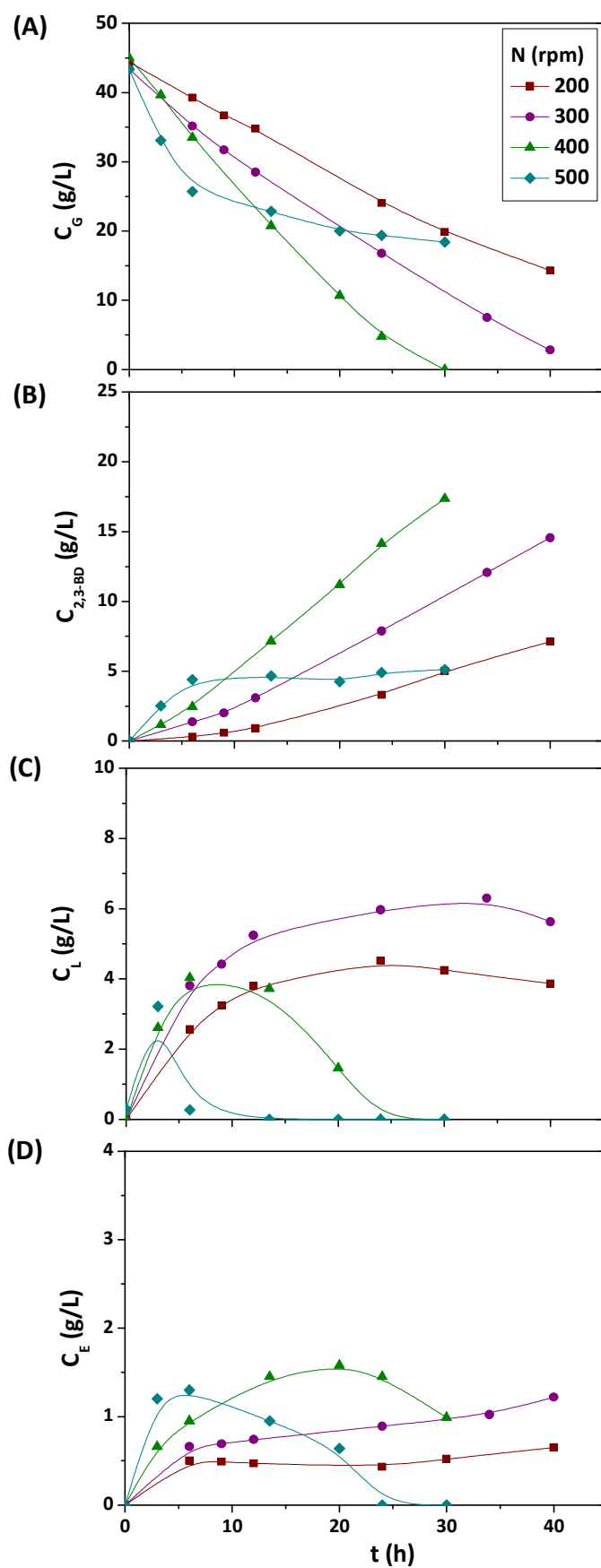


Figura 5.8 Evolución de la concentración de (A) glicerol, (B) 2,3-BD, (C) ácido láctico y (D) etanol para los experimentos realizados a diferentes velocidades de agitación.

A la vista de los resultados anteriores, cuando se emplea una velocidad de agitación de 400 rpm en el dispositivo experimental empleado, se alcanza la conversión total de glicerol en 30 h, conduciendo a 20,0 g/L de 2,3-BD, lo que corresponde a un rendimiento respecto al máximo teórico de 0,91 y una productividad de 0,67 g/(L·h). En el momento en el que se consume el sustrato carbonado, en el caldo de cultivo únicamente se detecta etanol en concentración inferior a 1 g/L y el precursor del 2,3-BD de la ruta metabólica, la acetoína, también en baja concentración (2,46 g/L).

ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA Y CONSUMO DE OXÍGENO

Para profundizar en la influencia de las condiciones hidrodinámicas en el proceso de producción de 2,3-BD empleando células en estado de *resting cells*, se va a proceder a un estudio de la transferencia y consumo de oxígeno en el sistema, análogo al desarrollado en el Apartado 4.3.1 del Capítulo anterior. En primer lugar, se ha realizado una estimación teórica del coeficiente de transferencia de materia ($k_L \cdot a$), según el procedimiento detallado en dicho Apartado. Las propiedades físicas del sistema y las condiciones de operación empleadas se encuentran recogidas en la Tabla 2.12 del Capítulo 2.

En la Figura 5.9 se muestran la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de materia para cada una de las velocidades de agitación empleado en este Apartado. La influencia con esta variable se muestra en la expresión [5.3].

$$k_L \cdot a \text{ (s}^{-1}\text{)} = 5,93 \cdot 10^{-9} \cdot N^{2,5} \text{ (rpm)} \quad [5.3]$$

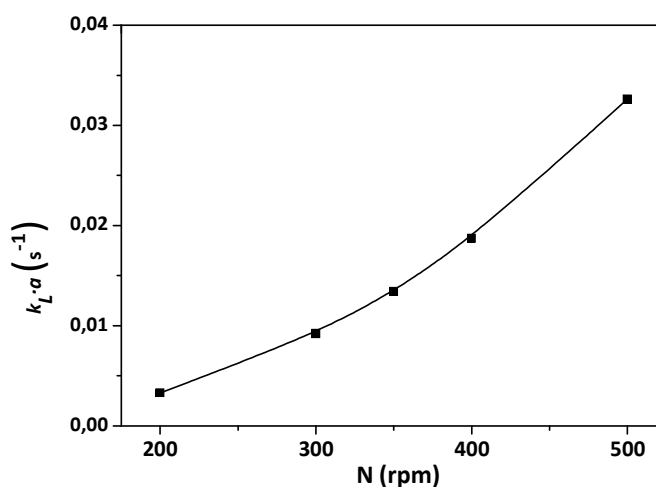


Figura 5.9 Influencia de la velocidad de agitación en el reactor tipo tanque agitado empleado en el coeficiente volumétrico de transferencia de materia.

Tal y como muestran los datos de concentración de oxígeno disuelto recogidos en la Tabla III.5 del Anexo III, la concentración de oxígeno disuelto presente en el caldo de cultivo para cada una de las velocidades de agitación estudiadas permanece en cero durante todo el experimento. Este hecho se traduce en que todo el oxígeno que está siendo transferido al caldo de cultivo, determinado por OTR, está siendo consumido por el biocatalizador. De esta forma, la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) puede ser determinada directamente a partir de los valores estimados del coeficiente de transferencia de materia, según muestra la expresión [5.4].

$$\text{OUR} (\text{mol}_{\text{O}_2}/(\text{L} \cdot \text{s})) = k_L a \cdot C_{\text{O}_2}^* \quad [5.4]$$

En los experimentos con células en *resting cells*, debido a que el oxígeno disuelto permanece en cero durante toda la biotransformación, OUR es constante. En la Tabla 5.7 se adjuntan los datos de la velocidad de consumo de oxígeno para los experimentos correspondientes al estudio de agitaciones de este bloque experimental.

Tabla 5.7 Estimación de la velocidad de transferencia de oxígeno para las diferentes condiciones hidrodinámicas del este bloque experimental.

EXPERIMENTO	N	OUR · 10 ⁶
	(rpm)	[mol _{O₂} /(L·s)]
M1	200	0,75
M2	300	2,01
M3	400	4,24
M4	500	7,00

Para evaluar la influencia de las condiciones hidrodinámicas en el proceso, en la Figura 5.10 se muestra la dependencia del rendimiento (A) y la selectividad (B) de cada uno de los metabolitos (2,3-BD, ácido láctico y etanol) así como la productividad a 2,3-BD (C) con OUR. Como se observa en la citada Figura, las condiciones hidrodinámicas conducen y determinan la distribución de productos, si bien es destacable que, en todos los casos, el 2,3-BD es el producto principal. La ruta metabólica de producción de 2,3-BD es la única activa en la práctica cuando la velocidad de consumo de oxígeno es igual o superior $4,24 \cdot 10^{-6} \text{ mol}_{\text{O}_2}/(\text{L} \cdot \text{s})$, como muestra la selectividad en torno a 1, lo que corresponde a velocidades de agitación iguales o superiores a 400 rpm. Para este valor de consumo de oxígeno, obtenido a 400 rpm, el rendimiento respecto al máximo teórico y la productividad alcanzan sus valores máximos. 0,91 y 0,67 g/(L·h), respectivamente. Se concluye por tanto que 400 rpm es la velocidad de agitación que optimiza el

proceso en el dispositivo experimental empleado y bajo las condiciones experimentales bajo las que opera y esta variable será fijada en dicho valor en los bloques experimentales desarrollados en los Apartados posteriores.

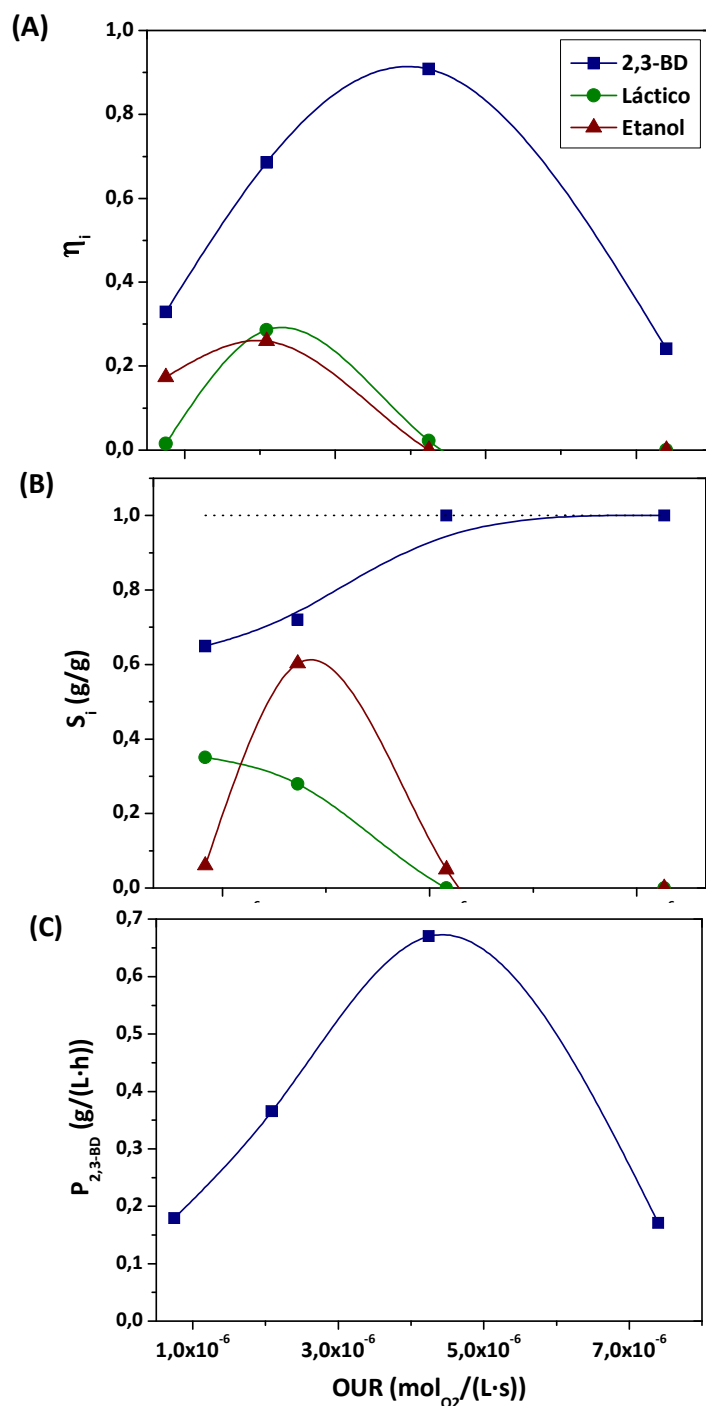


Figura 5.10 Influencia de la velocidad de consumo de oxígeno en (A) rendimiento de los productos metabólicos respecto al máximo teórico (2,3-BD, ácido láctico y etanol), (B) selectividad a cada uno de los metabolitos y (C) la productividad de 2,3-BD.

5.2.4 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE GLICERINA

El objeto del presente Apartado es el estudio de la influencia de la concentración inicial de glicerina en la producción de 2,3-BD. Para ello, se ha planteado un bloque experimental que contempla el empleo de distintas concentraciones de sustrato, comprendidas entre 45 y 250 g/L, tal y como se recoge en la Tabla 5.8. Cabe destacar que el empleo de un biocatalizador compuesto por células en estado de *resting cells* evita los problemas de inhibición por sustrato que se observan cuando el proceso se lleva a cabo con células en crecimiento. Por eso, en este Capítulo únicamente se plantean experimentos en *batch* para aumentar la concentración final alcanzada del producto de interés. Los resultados experimentales obtenidos en este bloque se encuentran adjuntados en la Tabla III.6 del Anexo III.

Tabla 5.8 Planificación experimental realizada para el estudio de la concentración inicial de glicerol. Condiciones: Reactor: biorreactor 1L; Volumen de trabajo (mL): 400; C_x (g/L) = 20 g/L; T (°C) = 30; N (rpm) = 400; Tampón: Fosfato 50 mM; pH control 5,5 (HCl 2M; NaOH 2M).

EXPERIMENTO	C_G^0 (g/L)
Z1	45
Z2	70
Z3	125
Z4	210
Z5	250

En la Figura 5.11 se muestra la evolución del consumo de sustrato y la producción de 2,3-BD para cada uno de los experimentos realizados en este bloque experimental, correspondientes al estudio de la influencia de la concentración inicial de glicerol. Como puede observarse, para todo el rango de concentraciones de sustrato estudiado se alcanza el consumo total de la fuente de carbono, en tiempos proporcionales a la concentración inicial de la misma, exceptuando la mayor de las concentraciones, 250 g/L, que, en las últimas 25 h de experimentación, se estabiliza en un valor cercano a 20 g/L. Hasta 120 h de experimentación, la velocidad de consumo de sustrato, determinada por la pendiente de las rectas marcadas por los puntos experimentales, es la misma, dado que dichas rectas son paralelas. Esta reducción o detención del consumo de sustrato podría indicar un envejecimiento de las células o agotamiento de moléculas energéticas (ATP, poder reductor, etc.), que no experimentan regeneración en estado de *resting cells*. Sin embargo, esta afirmación únicamente podría ser avalada mediante medidas de dichos compuestos a nivel intracelular.

La evolución del 2,3-BD, mostrada en la Figura 5.11 (B), sigue una tendencia similar a la anteriormente descrita para el sustrato. La velocidad de producción de 2,3-BD es constante e independiente a la concentración de sustrato empleada, lo que indica una ausencia de inhibición por parte del sustrato en la producción del compuesto de interés. A partir de 120 h, la concentración de 2,3-BD en el caldo de cultivo se ralentiza en la medida que también lo hacía el consumo de glicerol, alcanzándose valores superiores a 80 g/L.

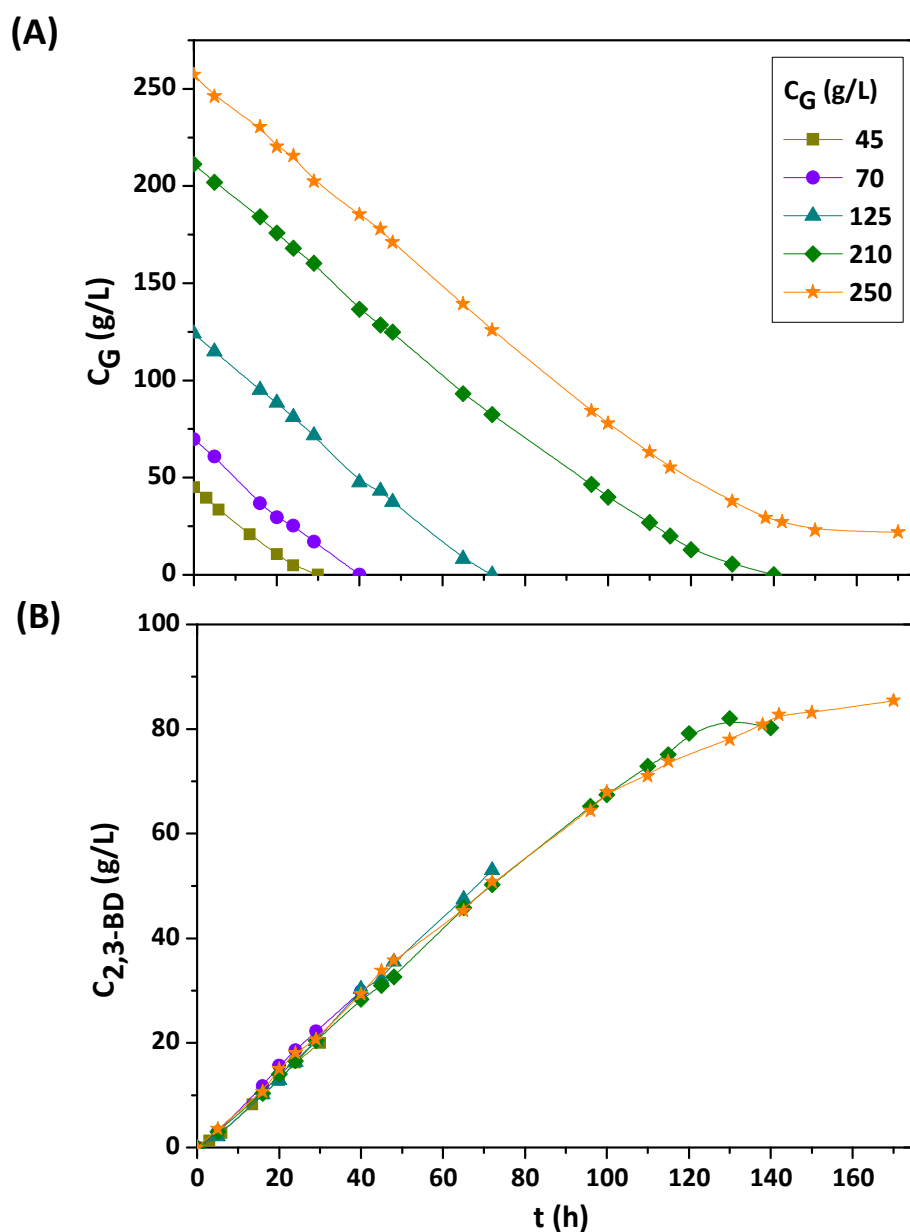


Figura 5.11 Evolución de la concentración de (A) glicerol y (B) 2,3-BD en los experimentos realizados con diferentes concentraciones iniciales de sustrato.

En la Figura 5.12 se muestra la influencia de la concentración inicial de glicerol en la concentración final alcanzada de 2,3-BD (A), el rendimiento respecto al máximo teórico (B) y la productividad a 2,3-BD (C). La concentración de 2,3-BD producida es proporcional a la concentración inicial de sustrato carbonado, observándose un aumento lineal, a excepción de la máxima concentración de glicerina empleada.

Para concentraciones iguales o inferiores a 125 g/L, el rendimiento respecto al máximo teórico permanece prácticamente constante en torno a 0,90. A partir de ese valor, se observa un suave descenso. Respecto a la tendencia observada en la productividad, se observa que este parámetro tiene un máximo cuando la concentración de sustrato carbonado está entre 70 y 125 g/L. A partir de este valor, debido al fenómeno anteriormente comentado de agotamiento celular, la productividad experimenta un descenso.

A la vista de los resultados anteriores, se puede concluir que el proceso de producción con células en estado de *resting cells* es viable y alcanza resultados satisfactorios en términos de concentración final de 2,3-BD en el caldo de cultivo (superior a 80 g/L). Sin embargo, es necesario un estudio profundo de los fenómenos de desactivación del biocatalizador y la posibilidad de regeneración de éste mediante la adición de algún cosustrato al medio, para poder asegurar la viabilidad económica de la operación a nivel industrial.

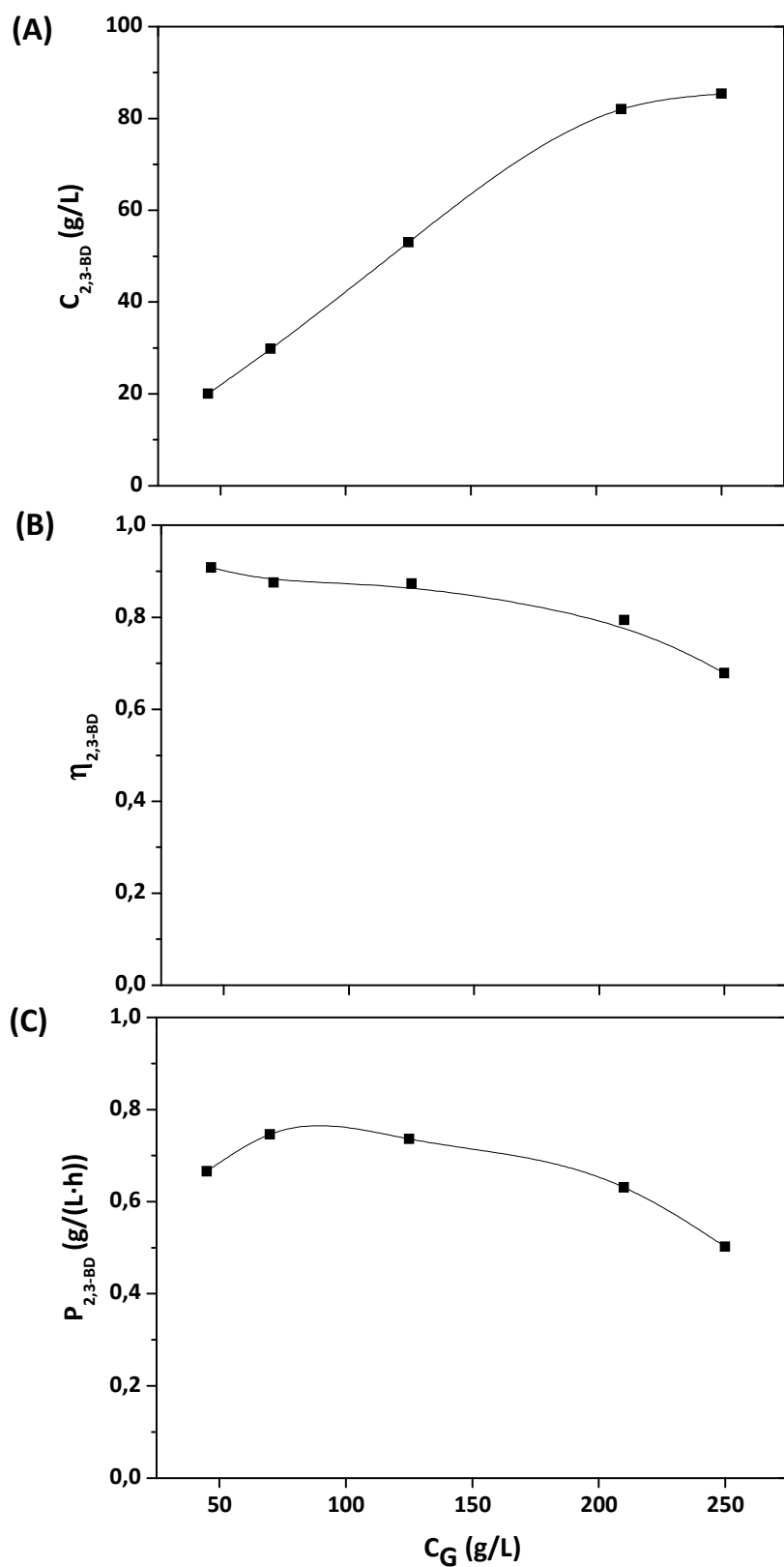


Figura 5.12 Influencia de la concentración inicial de glicerina en **(A)** la concentración máxima de 2,3-BD producida, **(B)** el rendimiento y **(C)** productividad de 2,3-BD.

5.2.5 COMPROBACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL PROCESO EMPLEANDO GLICEROL CRUDO COMO SUSTRATO

El fin último de la investigación desarrollada en esta Tesis Doctoral es desarrollar un proceso que permita revalorización del glicerol crudo, residuo del proceso de producción de biodiésel, para su posterior integración en una biorrefinería industrial. Por ello, en el presente Apartado se va a proceder a comprobar viabilidad de la biotransformación de glicerol crudo empleando un biocatalizador compuesto por células en estado de *resting cells*, teniendo en cuenta las conclusiones obtenidas en los distintos estudios de las variables abordadas en este Capítulo.

En la Tabla 5.9 se muestra la planificación experimental planteada en este estudio, que consta únicamente de un experimento realizado con la máxima concentración inicial de glicerol que condujo a resultados exitosos para el estudio de concentración de glicerina pura, 210 g/L. Si bien esta concentración no es la que conducía al rendimiento y productividad más altos (ver Figura 5.12), sí es con la que mayor concentración de 2,3-BD se alcanza, considerándose prioritaria la obtención de un caldo más concentrado en 2,3-BD para la el proceso industrial, debido a las limitaciones económicas de las operaciones posteriores de purificación o *downstream*. Cabe destacar que este experimento se ha desarrollado sin adicionar el tampón fosfato empleado en los anteriores estudios, debido a que dentro de las impurezas que contiene el glicerol crudo se encuentran gran cantidad de fosfatos. El mantenimiento del pH en 5,5 se consigue mediante el control externo de pH del que dispone el fermentador comercial. Este planteamiento proporciona ventajas tanto técnicas como económicas, puesto que la operación únicamente se desarrolla con el residuo procedente del proceso de producción de biodiésel, sin necesidad de formular ningún medio de cultivo en esta etapa. Los resultados experimentales obtenidos en este bloque se encuentran adjuntados en la Tabla III.7 del Anexo III.

Tabla 5.9 Planificación experimental realizada para el empleo de glicerol crudo como fuente de carbono. Condiciones: Reactor: biorreactor 1L; Volumen de trabajo (mL): 400; C_x (g/L) = 20 g/L T (°C) = 30; pH control 5,5 (HCl 2M; NaOH 2M); N (rpm) = 400.

EXPERIMENTO	C_G^0 (g/L)
Z6	210

Para una profundización en el comportamiento del sistema cuando se emplea glicerol crudo como sustrato, se han comparado los resultados de este bloque experimental con los

obtenidos cuando se empleó glicerina pura como sustrato, para la misma concentración inicial (210 g/L), que corresponde con el experimento Z4 del Apartado 5.2.4. En la Figura 5.13 se muestra la comparación de la evolución de la concentración de glicerina y 2,3-BD cuando se emplea glicerina pura y glicerol crudo como sustrato de la biotransformación.

Como puede observarse en la citada Figura, aunque la tendencia es similar para las dos fuentes de carbono empleadas y el consumo total se alcanza para ambas, la velocidad del proceso, tanto de consumo de sustrato como producción de 2,3-BD, es más ligeramente más lenta cuando se emplea la fuente cruda frente a la purificada. Mientras que el tiempo necesario para el agotamiento de la glicerina pura es 140 h, son requeridas 150 h para el consumo total de la concentración de glicerol crudo. Así mismo, la velocidad de producción de 2,3-BD y la concentración final alcanzada también es menor.

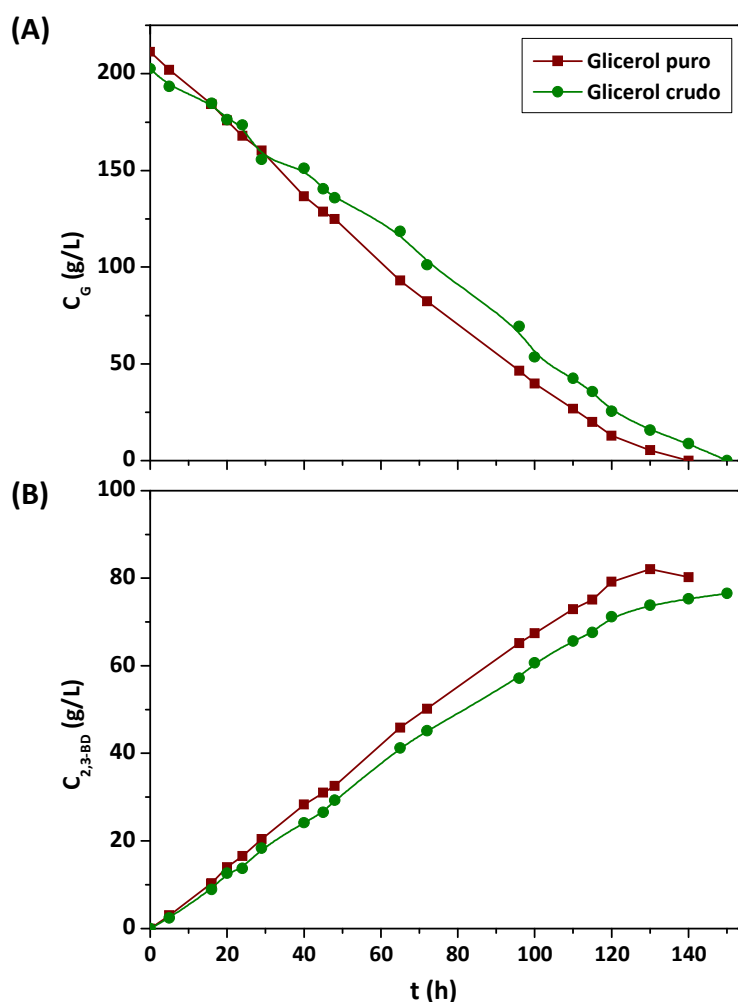


Figura 5.13 Comparación de la evolución de la concentración de **(A)** glicerol y **(B)** 2,3-BD cuando se emplea glicerol puro y crudo como sustrato carbonado.

En la Tabla 5.10 se incluye la comparación de los resultados obtenidos en ambos experimentos en términos de concentración final, rendimiento respecto al máximo teórico y productividad a 2,3-BD alcanzadas, cuyos valores reflejan las tendencias anteriormente comentadas. Cuando se emplea el sustrato puro el valor de todos los parámetros es más elevado. Sin embargo, las diferencias observadas con el sustrato crudo no son muy significativas, especialmente en lo referente al rendimiento a 2,3-BD observado respecto al máximo teórico. Por tanto, se concluye que la biotransformación de glicerol crudo empleando células en estado de *resting cells* y un medio libre de tampón es viable para la producción de 2,3-BD, obteniendo resultados del mismo orden de magnitud que los obtenidos con glicerina pura.

Tabla 5.10 Resultados comparativos de los experimentos realizados con glicerol crudo y puro como fuente de carbono.

EXPERIMENTO	Tipo de glicerol	C _{2,3-BD}	η _{2,3-BD}	P _{2,3-BD}
		(g/L)		[g/(L·h)]
Z4	PURA	82,02	0,794	0,631
Z6	CRUDA	76,53	0,772	0,510

5.3 INFLUENCIA DEL ESTADO DEL BIOCATALIZADOR EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE 2,3-BD

En el presente Apartado se va realizar una comparación entre los resultados obtenidos en el proceso de producción de 2,3-BD empleando células en crecimiento y en estado de *resting cells*, para determinar qué estado del biocatalizador sería el más adecuado para el desarrollo de la operación a nivel industrial, en su posible implementación en una biorrefinería integrada.

En la Tabla 5.11 se adjunta la información de los experimentos seleccionados para llevar a cabo dicha comparación. Se ha considerado necesario que la concentración inicial de glicerol así como la naturaleza de éste sean la misma en los experimentos comparados, para evitar llegar a conclusiones erróneas derivadas de la influencia de estas variables en el proceso. Se ha comparado la evolución de la biotransformación cuando se emplea una concentración inicial de glicerina pura de 120 g/L para el proceso en *batch*, así como 210 g/L. Así mismo, para esta concentración de glicerina, se ha incluido el experimento en *fed-batch* para el biocatalizador en crecimiento, cuya concentración total alimentada es también 210 g/L. Por último, se han comparado experimentos empleando glicerina cruda como sustrato carbonado.

Tabla 5.11 Resumen de los experimentos comparados para el estudio de la influencia del estado del biocatalizador en el proceso de producción 2,3-BD.

C _G (g/L)	Tipo de glicerol	Estado del biocatalizador	Operación	EXPERIMENTO
120	Puro	Crecimiento	Batch	G3
		<i>Resting cells</i>		Z3
210	Puro	Crecimiento	Batch	G6
			Fed-Batch	G9
		<i>Resting cells</i>	Batch	Z4
210	Crudo	Crecimiento	Fed-Batch	C3
		<i>Resting cells</i>	Batch	Z6

En la Figura 5.14 se ha representado la evolución de la concentración de biomasa, glicerina y 2,3-BD, para los experimentos realizados con concentración inicial de glicerina pura 120 g/L, empleando células en crecimiento y en estado de *resting cells*. En la citada Figura se incluye además la evolución de la concentración de etanol, el único subproducto obtenido en cantidad significativa para establecer la comparación. Como puede observarse en la citada Figura, tanto el consumo de sustrato como la producción de 2,3-BD tienen lugar a mayor velocidad, como se refleja en la pendiente de las rectas que describen ambas evoluciones. La concentración final de 2,3-BD alcanzada también es mayor cuando el biocatalizador empleado está compuesto por células en estado de *resting cells*. Además, la producción de 2,3-BD comienza desde el principio del experimento, cuando se emplean células en estado de *resting cells*, mientras que el inicio de la producción se retarda 12 h aproximadamente en el experimento con células en crecimiento.

Analizando la evolución en cada caso de la concentración de biomasa, cabe destacar que la concentración de biocatalizador presente es mayor para el experimento en *resting cells*, que permanece a lo largo de todo el experimento en 20 g/L, valor en el que fue optimizada. La evolución de la concentración de etanol es similar en ambos casos.

En la Figura 5.15 se ha representado la evolución de la concentración de biomasa, glicerina, 2,3-BD y etanol para los experimentos realizados con 210 g/L de glicerina pura, comparando la operación realizada con células en *resting cells* en *batch*, con los ensayos con células en crecimiento, tanto en *batch* como en *fed-batch*. En la Figura 5.16 se encuentra la comparación de la operación empleando glicerina cruda.

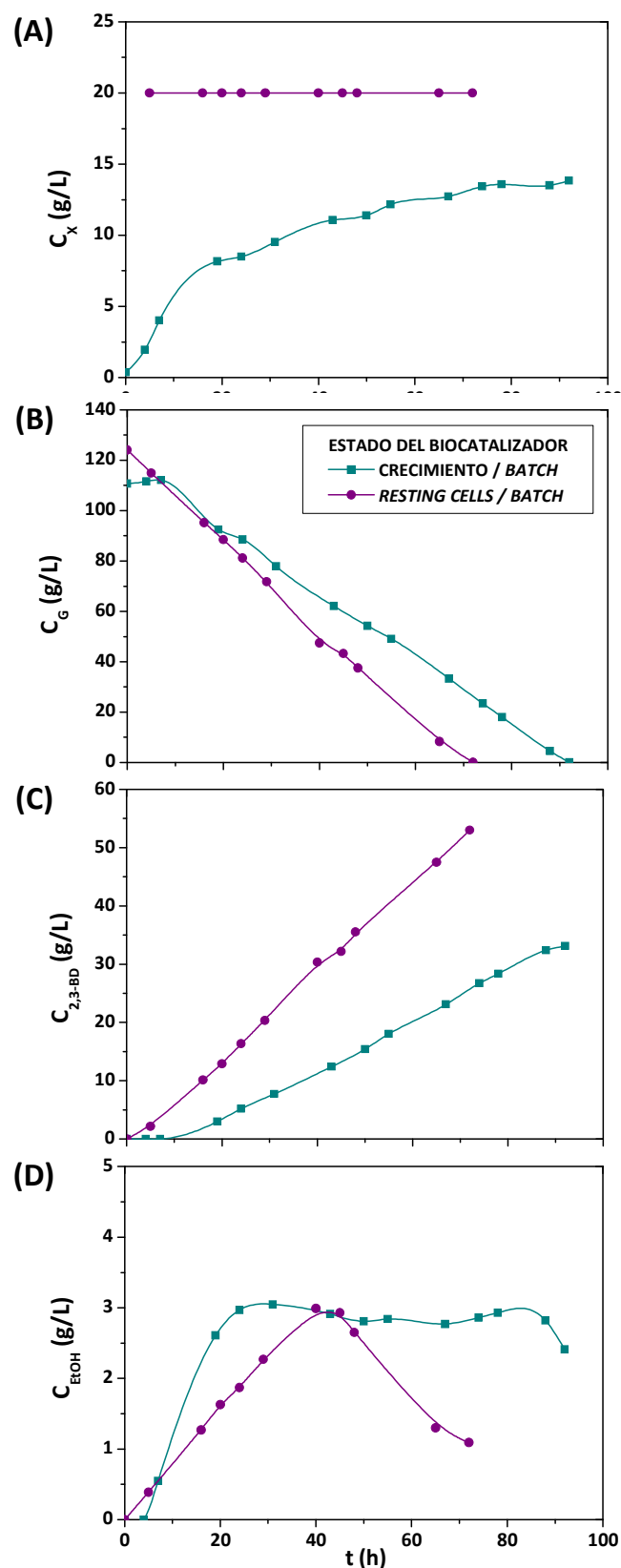


Figura 5.14 Comparación de la evolución de la concentración de (A) biomasa, (B) glicerol, (C) 2,3-BD y (D) etanol, cuando se emplean un biocatalizador compuesto por células en estado de crecimiento y en resting cells para la concentración inicial de glicerina 120 g/L (experimentos G3 y Z3).

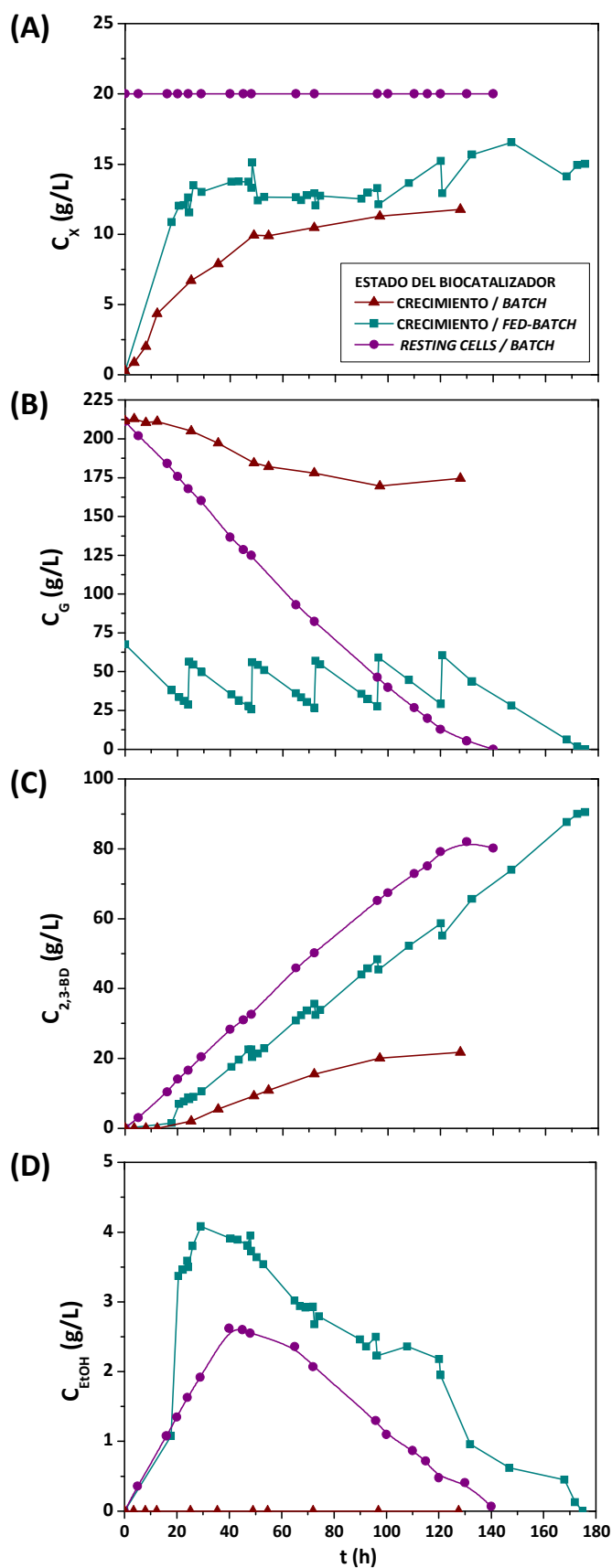


Figura 5.15 Comparación de la evolución de la concentración de (A) biomasa, (B) glicerol, (C) 2,3-BD y (D) etanol, cuando se emplean un biocatalizador compuesto por células en estado de crecimiento y en resting cells.

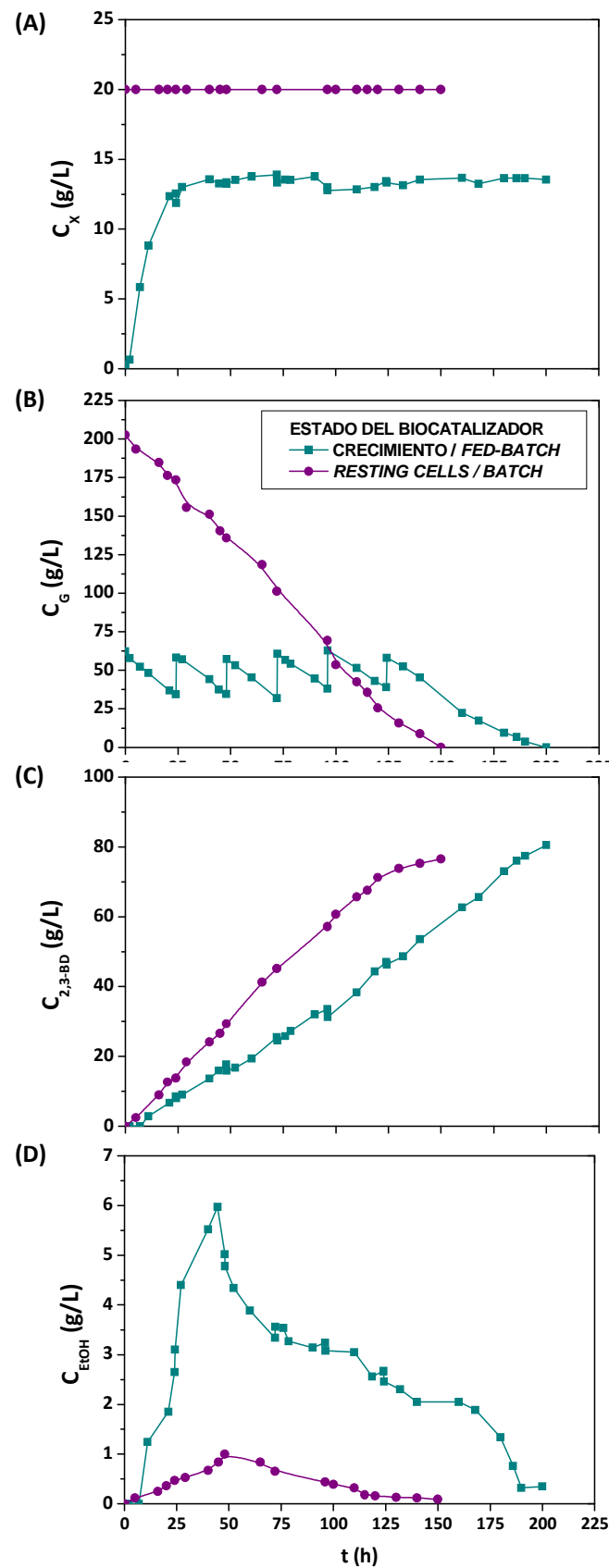


Figura 5.16 Comparación de la evolución de la concentración de (A) biomasa, (B) glicerol, (B) 2,3-BD y (D) etanol, cuando se emplean un biocatalizador compuesto por células en estado de crecimiento y en resting cells.

Cuando se emplean concentraciones iniciales de glicerina altas, en las que el sistema experimenta inhibición por sustrato, el empleo de un biocatalizador en estado de *resting cells* proporciona grandes mejoras del proceso, tal y como puede observarse en la Figura 5.15 para los experimentos en *batch* con células en crecimiento y *resting cells* con 210 g/L de concentración inicial de glicerina pura. La realización de la operación en *fed-batch* solventa dichos problemas de inhibición, si bien la velocidad de producción de 2,3-BD es más lenta empleando células en crecimiento que en estado de *resting cells*, observándose además la misma fase de latencia en la producción que para la concentración de 120 g/L, representada en la Figura 5.14. Esta fase de latencia tiene repercusiones en los valores de productividad, reduciéndolos notablemente. En este caso, la concentración final de 2,3-BD alcanzada es mayor. Respecto a la evolución de etanol, nuevamente no se observan grandes diferencias.

Las tendencias observadas cuando se emplea glicerol crudo como sustrato carbonado son similares a las anteriormente comentadas para el sustrato puro, siendo la única diferencia reseñable la menor producción de etanol cuando se emplean células en estado de *resting cells*. En la Tabla 5.12 se han recogido los resultados de los experimentos en estudio, en relación con la concentración de 2,3-BD final alcanzada, así como el rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico y la productividad. Cabe destacar que para concentraciones bajas de glicerina, llevando a cabo la operación en *batch*, el empleo de un biocatalizador compuesto por células en estado de *resting cells*, mejora la operación en términos de todos los parámetros definidos como criterio de comparación. Sin embargo, cuando la operación se lleva a cabo en *fed-batch* con células en crecimiento, tanto la concentración final alcanzada como el rendimiento a 2,3-BD es mayor que empleando un biocatalizador compuesto por células en estado de *resting cells*, si bien éste conduce a mejores valores de productividad. Esta tendencia es observada tanto cuando se emplea glicerina pura como glicerina cruda.

Las tendencias observadas para el rendimiento y la productividad son el reflejo de las limitaciones técnicas de la operación con los distintos biocatalizadores empleados. Como se ha comentado, cuando se emplean células en crecimiento se observa una fase de latencia en la producción de 2,3-BD, de aproximadamente 12-15 h, necesarias para alcanzar las condiciones metabólicas y de acidificación del medio requeridas para la producción del compuesto de interés. Sin embargo, cuando se emplean células en estado de *resting cells* la producción comienza cuando comienza el experimento, por tanto, se obtienen valores más altos en términos de productividad.

Tabla 5.12 Comparación de la concentración de 2,3-BD final alcanzada, rendimiento a 2,3-BD respecto al máximo teórico y productividad en los distintos experimentos seleccionados para el estudio de la influencia del estado del biocatalizador en el proceso de producción 2,3-BD.

Estado del biocatalizador	Tipo de glicerol	Operación	$C_{2,3-BD}$ (g/L)	$\eta_{2,3-BD}$	$P_{2,3-BD}$ [g/(L·h)]
Crecimiento	Puro	Batch	33,1	0,61	0,36
<i>Resting cells</i>			53,0	0,87	0,74
Crecimiento	Puro	Batch	21,8	0,21	0,17
		Fed-Batch	90,5	0,88	0,52
<i>Resting cells</i>		Batch	82,0	0,79	0,63
Crecimiento	Crudo	Fed-Batch	80,5	0,90	0,40
<i>Resting cells</i>		Batch	76,5	0,77	0,51

Sin embargo, como se ha comentado en el Apartado 5.2 del presente Capítulo, el empleo de células en estado de *resting cells* presenta limitaciones respecto a la viabilidad celular con el tiempo, cuya actividad se ve detenida a partir de 5 d de experimentación. Por tanto, la concentración final alcanzada de 2,3-BD y el rendimiento es menor que con las células en crecimiento. Si bien los resultados obtenidos son bastante buenos (la concentración de 2,3-BD ronda los 80 g/L), pudiendo ser mejorados con un estudio de regeneración de cofactores metabólicos.

Por último, cabe destacar que la operación con un biocatalizador en estado de *resting cells* lleva asociada facilidades técnicas, debido a la posibilidad de obtención del biocatalizador de forma paralela a la etapa de producción, minimizando el tiempo de operación.

5.4 BIBLIOGRAFÍA

Calzada, J.; Alcon, A.; Santos, V. E. y Garcia-Ochoa, F. (2011). Mixtures of *Pseudomonas putida* CECT 5279 cells of different ages: Optimization as biodesulfurization catalyst. *Process Biochemistry*, 46: 1323-1328.

Gomez, E.; Alcon, A.; Escobar, S. y Garcia-Ochoa, F. (2015). Effect of fluiddynamic conditions on growth rate and biodesulphurization capacity of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *Biochemical Engineering Journal*, 99: 138-146.

Hu, Z.; Zheng, Y. y Shen, Y. (2011). Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in air lift reactor. *Bioresource Technology*, 102: 7177-7182.

Khan, A.; Bhide, A. y Grade, R. (2009). Mannitol production from glycerol by resting cells of *Candida magnoliae*. *Bioresource Technology*, 100: 4911-4913.

Kumar, V.; Sankaranarayanan, M.; Durgapal, M.; Zhou, S.; Ko, Y.; Ashok, S.; Sarkar, R. y Park, S. (2013). Simultaneous production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol using resting cells of the lactate dehydrogenase-deficient recombinant *Klebsiella pneumoniae* overexpressing an aldehyde dehydrogenase. *Bioresource Technology*, 135: 555-563.

Lidia, S. y Stanislaw, B. (2012). Production of dihydroxyacetone from an aqueous solution of glycerol in the reaction catalyzed by an immobilized cell preparation of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* ATCC 621. *European Food Research Technology*, 235 (6): 1125-1132.

Liu, Z.; Qin, J.; Gao, C.; Hua, D.; Ma, C.; Li, L.; Wang, Y. y Xu, P. (2011). Production of (2S, 3S)-2,3-butanediol and (3S)-acetoin from glucose using resting cells of *Klebsiella pneumonia* and *Bacillus subtilis*. *Bioresource Technology*, 102: 10741-10744.

Martin, A. B.; Alcon, A.; Santos, V. E. y Garcia-Ochoa, F. (2005). Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT 5279 for DBT biodesulfurization: Influence of operational condition. *Energy & Fuels*, 19(3): 775-782.

Martinez, I.; Santos, V. E.; Gomez, E. y Garcia-Ochoa, F. (2016). Biodesulfurization of bidenzothiophene by resting cells of *Pseudomonas putida* CECT 5279: Influence of the oxygen transfer rate in the scale-up from shaken flask to stirred tank reactor. *Journal of Chemical technology and Biotechnology*, 91(1): 184-189.

Ramakrisnan, G. G.; Nehru, G.; Suppuram, P.; Balasubramaniam, S.; Gulab, B. R. y Subramanian, R. (2015). Bio-transformation of glycerol to 3-hydroxypropionic acid using resting cells of *Lactobacillus reuteri*. *Current Microbiology*, 71: 517-523.

Wong, C.; Huang, C.; Chen, W. y Chang, J. (2011). Converting crude glycerol to 1,3-propanediol using resting and immobilized *Klebsiella* sp. HE-2 cells. *Biochemical Engineering Journal*, 58-59: 177-183.

Zhao, L. I.; Ma, X.; Zheng, Y.; Zhang, J.; Wei, G. y Wei, D. (2009). Over-expression of glycerol dehydrogenase and 1,3-propanediol oxidoreductase in *Klebsiella pneumoniae* and their effects on conversion of glycerol into 1,3-propanediol in resting cell system. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84: 626-632.

CAPÍTULO 6

MODELO CINÉTICO DEL PROCESO

La modelización matemática de bioprocesos es una herramienta de gran utilidad en el campo de la biotecnología industrial. Debido a la complejidad del metabolismo microbiano, en el que intervienen un gran número de reacciones y mecanismos de regulación, es creciente el interés por el desarrollo de modelos matemáticos que permitan entender, predecir y optimizar las propiedades y comportamiento de los sistemas biológicos. Esencialmente la finalidad de un modelo cinético es poder describir aquellos aspectos de la maquinaria celular que están involucrados en el proceso biotecnológico de interés (Almquist y col., 2014).

Un modelo cinético consiste en la definición de ecuaciones que relacionan velocidades y concentraciones de productos y reactivos que, integradas en un balance de materia, permiten la predicción de la conversión de los sustratos y el rendimiento de cada producto en unas condiciones de operación dadas (Nielsen y Villadsen, 1992).

El desarrollo de un modelo cinético consta de las siguientes etapas (García-Ochoa y Romero, 1993):

- 1. Formulación del modelo cinético**, que consiste en la suposición de uno o varios esquemas de reacción de las especies implicadas en el proceso y suposición de ecuaciones cinéticas para cada reacción.
- 2. Determinación de valores de los parámetros del modelo**, mediante el ajuste del modelo cinético a los datos experimentales. En este estudio, se empleará el método de las velocidades de reacción para calcular los valores preliminares de dichos parámetros y

el método de las velocidades de producción para obtener los valores definitivos (García-Ochoa y col., 1992).

3. Discriminación de los modelos propuestos, mediante la aplicación de criterios estadísticos y físicos a los parámetros obtenidos en el punto anterior.

El objeto del presente Capítulo es el desarrollo de un modelo cinético que permita la descripción del proceso de transformación de glicerina (tanto pura como cruda) en 2,3-BD empleando como biocatalizador la cepa *Raoultella terrigena* CECT 4519, tanto en estado de crecimiento como en estado de *resting cells*. Para ello, se ha formula el modelo cinético correspondiente y se determinan los parámetros cinéticos del mismo mediante el empleo de las técnicas de cálculo y ajuste adecuadas.

Cabe destacar que no se ha encontrado ningún precedente en bibliografía sobre la modelización matemática del proceso, por lo que este modelo no se puede basar en ninguna información previa.

El objetivo del presente apartado es la predicción del comportamiento del sistema en *fed-batch* a partir del modelo obtenido mediante ajuste a datos obtenidos en *batch*. Para ello se emplearán los datos experimentales de experimentos llevados a cabo en *batch* en condiciones lo más cercanas posible a los que se pretende posteriormente predecir.

6.1 FORMULACIÓN DEL MODELO CINÉTICO

Para la formulación del modelo cinético es necesario, en primer lugar, proponer, al menos, un esquema de reacción para las especies implicadas en el bioproceso. Como se comentó en el Capítulo 4, el metabolismo del glicerol está constituido por una extensa red de reacciones. Debido a la complejidad del sistema biológico, el esquema de reacción propuesto va a ser necesariamente una simplificación del extenso metabolismo celular.

Las especies implicadas en el modelo cinético del proceso de producción de 2,3-BD son aquellas detectadas en el caldo de cultivo durante la fermentación (glicerol, 2,3-BD, acetoína, ácido láctico, ácido acético y etanol) así como el biocatalizador. Los metabolitos producidos que no son el producto de interés ni su molécula precursora en la ruta metabólica (2,3-BD y acetoína), se producen en pequeña extensión y su concentración en muchos casos es prácticamente despreciable frente a la del producto de interés. Por este motivo, se va a definir un compuesto denominado “subproductos” (SP), que corresponde con un pseudocomponente cuya evolución de la concentración corresponde con la evolución de la suma de las

concentraciones de ácido láctico, ácido acético y etanol, siguiendo así la teoría de *lumping* o agrupamiento por pseudocomponentes, desarrollada por Weekman en 1968 para la simplificación de una red de reacción (Weekman, 1968).

La observación experimental de la evolución de los compuestos involucrados en el modelo cinético es determinante para el planteamiento del modelo cinético exitoso. De tal forma que el planteamiento de la red de reacciones y la expresión de la ecuación cinética de cada una de las reacciones que lo constituyen, deben intentar explicar el comportamiento macroscópico del sistema.

Para el planteamiento del modelo cinético del metabolismo del glicerol empleando células en estado de crecimiento se han tenido en cuenta las siguientes puntualizaciones, avaladas por el conocimiento sobre el comportamiento del sistema adquirido en los Capítulos anteriores. A modo ilustrativo, se muestra en la Figura 6.1 la evolución de los compuestos involucrados en la fermentación de glicerina en *batch*.

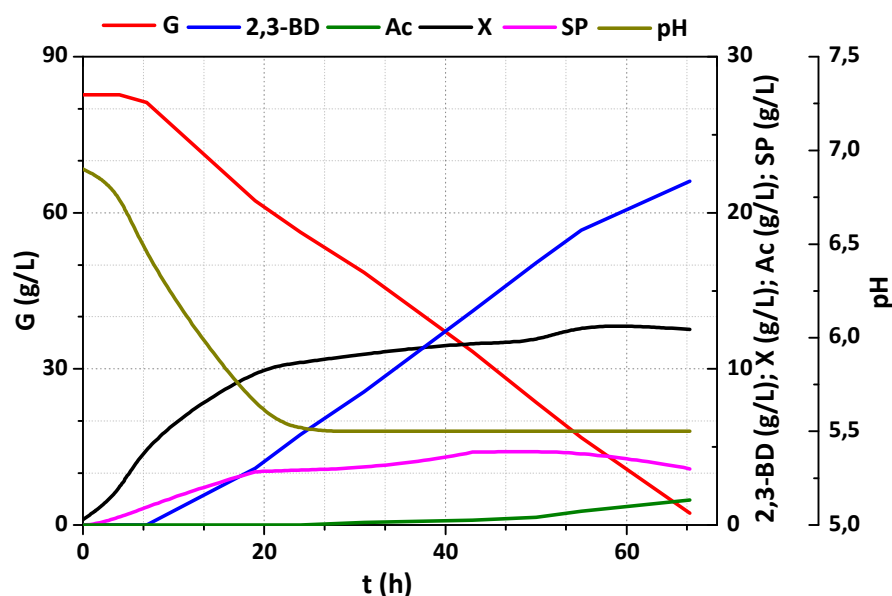


Figura 6.1 Evolución habitual de la concentración de glicerina, 2,3-BD, biomasa, acetoina, subproducto y pH en un experimento en batch de fermentación de glicerina pura.

- El crecimiento de *Raoultella terrigena* en las condiciones empleadas experimenta una desviación respecto al crecimiento bacteriano sigmoidal. Esta tendencia se ha asociado con la caída del pH experimentada desde pH neutro a pH 5,5, valor en el que, posteriormente se controla el pH en los experimentos de producción.

- La producción del pseudocompuesto SP se lleva a cabo principalmente durante la etapa de crecimiento bacteriano, observándose una caída a partir del alcance de la fase estacionaria del crecimiento. La hipótesis que podría explicar el consumo de los subproductos es que están siendo empleados por la bacteria para obtener energía para el mantenimiento del metabolismo celular.
- La producción de 2,3-BD no está asociada al crecimiento bacteriano, teniendo lugar cuando se alcanza la fase estacionaria del mismo. Está fuertemente influida por el pH, dándose lugar a partir de pH ligeramente ácidos (en torno a pH 6).
- La acetoína es el precursor en la ruta metabólica de síntesis de 2,3-BD, correspondiendo con el esquema de reacción planteado en la ecuación [6.1], tal y como han indicado diversos autores en bibliografía (Celinska y Grajek, 2009; Ji y col., 2011). Sin embargo, se ha observado experimentalmente que la acumulación de acetoína en el caldo de cultivo únicamente es significativa cuando la fuente de carbono principal, el glicerol, se encuentra próxima a su agotamiento, empleando el 2,3-BD como sustrato a partir de ese momento, suposición que se recoge en la ecuación [6.2]. Atendiendo a las tendencias observadas, se puede afirmar que en la síntesis de 2,3-BD a partir de glicerol, la etapa limitante es la reacción de producción de 2,3-BD a partir de glicerol, siendo la velocidad de la reacción de crecimiento mucho mayor en las condiciones de operación empleadas.



Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se plantea el siguiente esquema de reacción (formado por las ecuaciones [6.3] a [6.6]) propuesto para el metabolismo del glicerol empleando células en estado de crecimiento. Cabe destacar que, debido a la complejidad de los sistemas biológicos, los coeficientes estequiométricos (Y_{ij}) de las reacciones aquí planteadas no pueden ser calculados mediante un balance atómico, a diferencia de lo que ocurre en los sistemas químicos convencionales. Por ello, serán considerados como parámetros del modelo y su valor será determinado en el ajuste del modelo a los datos experimentales.

- Consumo de glicerol para el crecimiento celular y la producción de subproductos (r_1),



- Consumo de glicerol para la producción de 2,3-BD (r_2),

$$Y_{G/2,3BD} \cdot G \xrightarrow{r_2} 2,3BD \quad [6.4]$$

- Reversibilidad de la producción de 2,3-BD para la síntesis de su precursor, acetoína, (r_3),

$$Y_{2,3BD/Ac} \cdot 2,3BD \xrightarrow{r_3} Ac \quad [6.5]$$

- Consumo de los subproductos para la obtención de energía para el mantenimiento celular (r_4),

$$SP \xrightarrow{r_4} \text{Energía} \quad [6.6]$$

Las ecuaciones cinéticas que se proponen para describir la velocidad de reacción de cada una de las reacciones propuestas en el modelo cinético son las siguientes:

$$r_1(g_G/L \cdot h) = \mu \cdot C_X \cdot \left[1 - \frac{C_X}{C_X^{máx}} \right] \cdot e^{(pH-5,5)} \quad [6.7]$$

$$r_2(g_{2,3BD}/L \cdot h) = k_{BDO} \cdot C_X \cdot e^{(pH-5,5)} \quad [6.8]$$

$$r_3(g_{Ac}/L \cdot h) = k_{Ac} \cdot C_X / C_G \quad [6.9]$$

$$r_4(g_{SP}/L \cdot h) = m_s \cdot C_X \quad [6.10]$$

El modelo en forma de velocidades de producción viene expresado por las ecuaciones [6.11] a [6.15].

$$R_X(g_X/L \cdot h) = dC_X/dt = r_1 \quad [6.11]$$

$$R_G(g_G/L \cdot h) = dC_G/dt = r_1 = -Y_{G/X} \cdot r_1 - Y_{G/2,3BD} \cdot r_2 \quad [6.12]$$

$$R_{2,3BD}(g_{2,3BD}/L \cdot h) = dC_{2,3BD}/dt = r_2 - Y_{2,3BD/Ac} \cdot r_3 \quad [6.13]$$

$$R_{Ac}(g_{Ac}/L \cdot h) = dC_{Ac}/dt = r_3 \quad [6.14]$$

$$R_{SP}(g_{SP}/L \cdot h) = dC_{SP}/dt = -Y_{SP/X} \cdot r_1 - r_4 \quad [6.15]$$

Incluyendo en las ecuaciones [6.11] a [6.15] las expresiones [6.7] a [6.10] que describen las velocidades de reacción, queda definido el modelo cinético que se va a utilizar para la descripción de la producción de 2,3-BD a partir de glicerina empleando como biocatalizador *Raoultella terrigena* en estado de crecimiento, expresado por las siguientes ecuaciones:

$$dC_X/dt(g_X/L \cdot h) = \mu \cdot C_X \cdot \left[1 - C_X/C_X^{m\acute{a}x} \right] \cdot e^{(pH-5,5)} \quad [6.16]$$

$$dC_G/dt(g_G/L \cdot h) = -Y_{G/X} \cdot \mu \cdot C_X \cdot \left[1 - C_X/C_X^{m\acute{a}x} \right] \cdot e^{(pH-5,5)} - Y_{G/2,3BD} \cdot k_{BDO} \cdot C_X \cdot e^{(pH-5,5)} \quad [6.17]$$

$$dC_{2,3BD}/dt(g_{2,3BD}/L \cdot h) = k_{BDO} \cdot C_{2,3BD} \cdot e^{(pH-5,5)} - Y_{2,3BD/Ac} \cdot k_{Ac} \cdot C_X/C_G \quad [6.18]$$

$$dC_{Ac}/dt(g_{Ac}/L \cdot h) = k_{Ac} \cdot C_X/C_G \quad [6.19]$$

$$dC_{SP}/dt(g_{SP}/L \cdot h) = -Y_{SP/X} \cdot \mu \cdot C_X \cdot \left[1 - C_X/C_X^{m\acute{a}x} \right] \cdot e^{(pH-5,5)} - m_s \cdot C_X \quad [6.20]$$

6.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL MODELO CINÉTICO EN CRECIMIENTO

Una vez planteado el modelo cinético, éste se ajusta a los datos experimentales con el objetivo de obtener los parámetros del mismo. Debido a que el modelo cinético es un sistema de ecuaciones diferenciales y que los datos experimentales son datos integrales, para la determinación de los parámetros del modelo cinético es necesaria la integración numérica de las ecuaciones [6.16] a [6.20] y acoplar ese algoritmo a otro de regresión de tipo no lineal.

Para facilitar la convergencia del algoritmo de cálculo, es necesario aportar valores iniciales de los parámetros del orden de magnitud correcto. Para alcanzar este objetivo, inicialmente se realizó la determinación de los parámetros del modelo ecuación a ecuación, es

decir, empleando un método en simple respuesta. En la Tabla 6.1 se muestran los valores iniciales empleados para el ajuste en múltiple respuesta.

Una vez conocidos los valores iniciales, éstos se han ajustado a los resultados experimentales de las fermentaciones llevadas a cabo en *batch* con células en estado de crecimiento, cuando se emplea tanto glicerol puro como crudo como sustrato carbonado.

Tabla 6.1 Valores iniciales de los parámetros cinéticos obtenidos en el ajuste del modelo cinético a los datos experimentales en simple respuesta.

Parámetros Cinéticos	Valor inicial
μ (h^{-1})	0,110
$C_X^{\text{máx}}$ (g_X/L)	12,50
k_{BDO} [$\text{g}_{2,3\text{BD}}/(\text{g}_X \cdot \text{L} \cdot \text{h})$]	0,04
k_{Ac} [$\text{g}_{\text{Ac}} \cdot \text{g}_G/(\text{g}_X \cdot \text{L} \cdot \text{h})$]	0,05
m_s [$\text{g}_{\text{SP}}/(\text{g}_X \cdot \text{L} \cdot \text{h})$]	0,001
$Y_{G/X}$ (g_G/g_X)	1,0
$Y_{G/2,3\text{BD}}$ ($\text{g}_G/\text{g}_{2,3\text{BD}}$)	3,0
$Y_{2,3\text{BD}/\text{Ac}}$ ($\text{g}_{2,3\text{BD}}/\text{g}_{\text{Ac}}$)	1,5
$Y_{\text{SP}/X}$ (g_G/g_X)	0,5

En el caso de la glicerina pura, se ha realizado un ajuste simultáneo de los experimentos que emplean 80 y 110 g/L como concentración inicial de glicerina (ya que incluyen los intervalos de concentración de glicerol empleados en *fed-batch*), correspondientes a los ensayos G2 y G3 recogidos en el Apartado 4.4 del Capítulo 4. Asimismo, para la obtención de los parámetros cinéticos cuando se emplea glicerol cruda se han empleado los resultados experimentales obtenidos en el ensayo C1, que emplea 75 g/L como concentración inicial de fuente de carbono (por la misma razón que para el caso del glicerol puro).

En la Tabla 6.2 se muestra los valores de los parámetros cinéticos obtenidos como el resultado del ajuste, mostrándose tanto el valor óptimo como el error del mismo. En primer lugar cabe destacar que el modelo parece completamente capaz de explicar los resultados experimentales tanto para el caso de glicerol puro como crudo. Por otro lado, se puede observar que los resultados obtenidos muestran que, en el caso de la glicerina pura, los dos experimentos ajustados se pueden representar con el mismo conjunto de parámetros cinéticos.

Tabla 6.2 Valores óptimos de los parámetros cinéticos empleados en el ajuste del modelo cinético a los datos experimentales de la fermentación en batch con células en crecimiento cuando se emplea glicerol puro y glicerol crudo como fuente de carbono.

PARÁMETROS CINÉTICOS	GLICERINA PURA	GLICEROL CRUDO
μ (h^{-1})	$0,101 \pm 0,006$	$0,122 \pm 0,006$
$C_X^{m\acute{a}x}$ (g_X/L)	$12,74 \pm 0,51$	$17,10 \pm 0,90$
k_{BDO} [$g_{2,3BD}/(g_X \cdot L \cdot h)$]	$0,038 \pm 0,002$	$0,039 \pm 0,006$
k_{Ac} [$g_{Ac} \cdot g_G / (g_X \cdot L \cdot h)$]	$0,056 \pm 0,030$	$0,048 \pm 0,006$
m_s [$g_{SP} / (g_X \cdot L \cdot h)$]	$0,0020 \pm 0,0018$	$0,0012 \pm 0,006$
$Y_{G/X}$ (g_G/g_X)	$1,15 \pm 0,19$	$1,34 \pm 0,19$
$Y_{G/2,3BD}$ ($g_G/g_{2,3BD}$)	$2,66 \pm 0,19$	$1,40 \pm 0,20$
$Y_{2,3BD/Ac}$ ($g_{2,3BD}/g_{Ac}$)	$1,12 \pm 1,10$	$1,38 \pm 1,13$
$Y_{SP/X}$ (g_{SP}/g_X)	$0,41 \pm 0,09$	$0,94 \pm 0,12$

Cabe destacar que el empleo de la fuente de carbono pura o cruda modifica ligeramente el valor de los parámetros, si bien todos se encuentran dentro del mismo intervalo. Las únicas diferencias significativas se observan en el parámetro $C_X^{m\acute{a}x}$ y el rendimiento $Y_{G/BDO}$. En el primer caso, el parámetro determina la concentración máxima de biomasa alcanzada, mucho mayor en el caso del glicerol crudo, por lo que la diferencia del valor de los parámetros representa la diferencia observada experimentalmente. Respecto al rendimiento, este parámetro determina los gramos de glicerina necesarios para obtener un gramo de 2,3-BD en cada caso. A menor valor del rendimiento, mayor es el flujo del metabolismo bacteriano dirigido a 2,3-BD. A la vista de los valores del rendimiento en ambos casos, se puede afirmar que el empleo de glicerina cruda proporciona una conversión a 2,3-BD más eficiente (menor cantidad de glicerina invertida en la producción de 1 g de 2,3-BD).

En la Figura 6.2 se muestra la evolución de los datos experimentales de concentración de biomasa, glicerol, 2,3-BD, acetoina y el subproducto y la predicción obtenida al aplicar el modelo cinético propuesto empleando el valor óptimo de los parámetros cinéticos mostrado en la Tabla 6.2, para los experimentos en *batch* con glicerina pura en concentración inicial de 80 g/L (A) y 110 g/L (B) y con glicerina cruda en concentración inicial de 75 g/L (C). Como se aprecia en la citada Figura, las predicciones del modelo cinético se ajustan correctamente a los datos experimentales sin observarse desviaciones significativas.

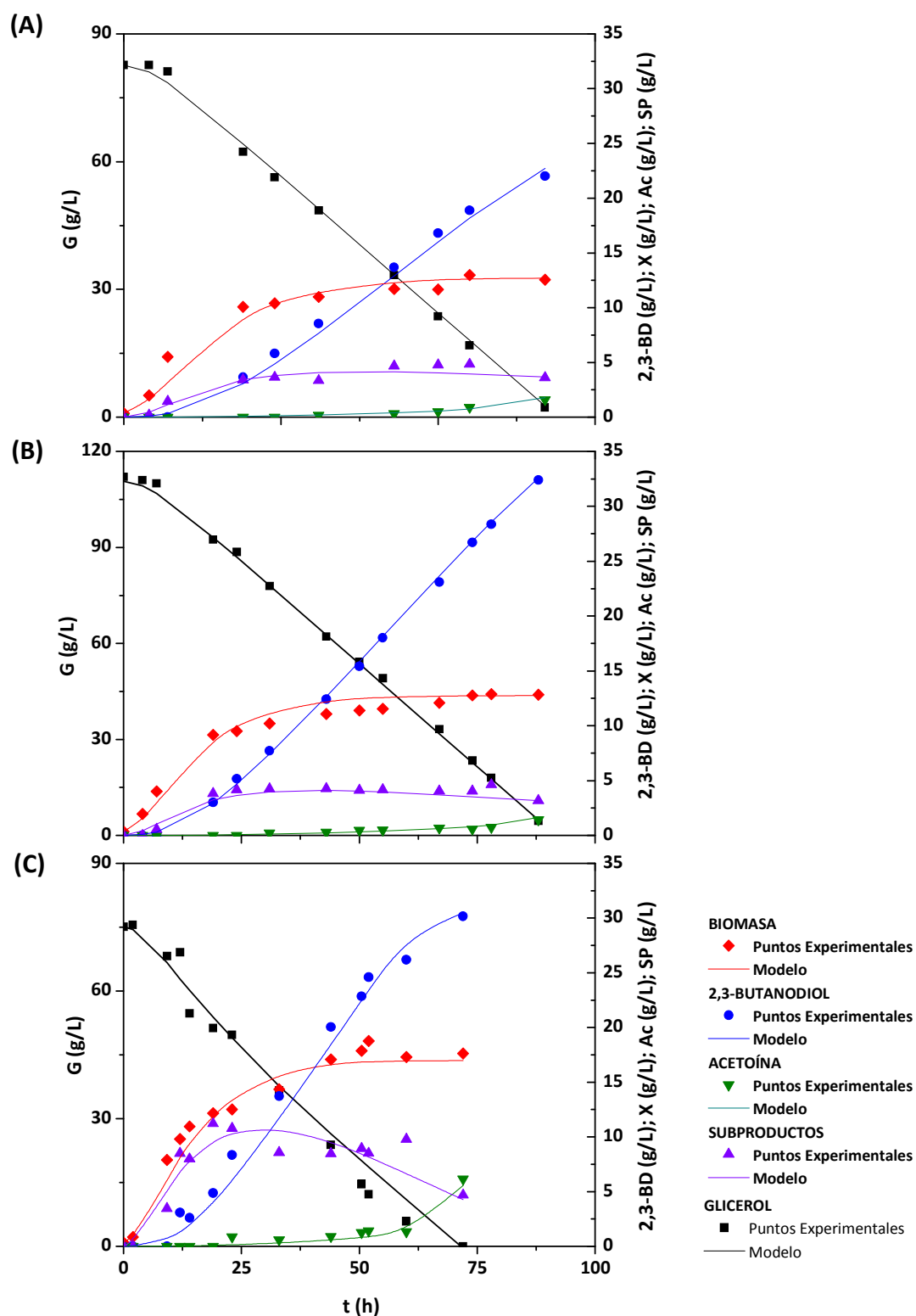


Figura 6.2 Comparación de la evolución de los valores experimentales de la concentración de glicerol, biomasa, 2,3-BD, acetoína y subproductos y los simulados por el modelo cuando se emplea un biocatalizador en estado de crecimiento, para los experimentos con glicerina pura y concentración inicial **(A)** 80 g/L y **(B)** 110 g/L y glicerol crudo y concentración inicial **(C)** 75 g/L.

Para cuantificar la bondad del ajuste matemático, se deben analizar los parámetros estadísticos del mismo. A saber, el error cuadrático medio (ECM), a suma de residuos al cuadrado (SRC), el porcentaje de variación explicada (VE), así como la F-Fisher experimental, definidos en el Apartado 2.5.3 del Capítulo 2. En la Tabla 6.3 se muestran los parámetros estadísticos de los ajustes del modelo cinético cuando se emplea glicerina pura y glicerol crudo como sustrato. Como puede observarse en la citada Tabla, ni ECM ni SRC adquieren valores demasiado elevados, indicando una buena relación entre el valor experimental de las variables y el predicho por el modelo. Así mismo, el porcentaje de variación explicada por el modelo es superior al 99% de la variación experimental observada y la F-Fisher experimental es muy superior al valor tabulado para el 95% de confianza (2,83), indicando la adecuación del modelo propuesto de acuerdo a la hipótesis de Fisher. Los parámetros estadísticos reafirman por tanto la validez del modelo cinético propuesto para el proceso de interés.

Tabla 6.3 Parámetros estadísticos del ajuste del modelo a los datos experimentales de las fermentaciones en batch con células en crecimiento cuando se emplea glicerol puro y glicerol crudo como fuente de carbono.

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	GLICERINA PURA	GLICEROL CRUDO
ERMC	0,87	0,99
F-Fisher	$1,48 \cdot 10^4$	$3,23 \cdot 10^3$
SRC	91,3	64,2
VE (%)	99,7	99,4

6.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL MODELO CINÉTICO EN ESTADO DE *RESTING CELLS*

Para el caso del modelo cinético empleando células en estado de *resting cells* se ha empleado el mismo modelo cinético que el desarrollado cuando las células se encuentran en crecimiento, imponiendo las particularidades del sistema:

- En estado de *resting cells*, el crecimiento bacteriano se encuentra impedido debido a que el medio de cultivo carece de los nutrientes necesarios.
- Asimismo, el metabolismo bacteriano se encuentra dirigido hacia el producto de interés, siendo mínimas las cantidades del resto de productos de la ruta fermentativa producidos.

- Además, en los experimentos empleando células en estado de *resting cells* el pH se controla desde el comienzo del experimento, eliminando así la influencia de la variación de esta variable.

En base a lo anteriormente expuesto, el modelo cinético empleado en este caso queda simplificado a las expresiones [6.21] y [6.22].

$$dC_G/dt (g_G/L \cdot h) = -Y_{G/2,3BD} \cdot k_{BDO} \cdot C_X \quad [6.21]$$

$$dC_{2,3BD}/dt (g_{2,3BD}/L \cdot h) = k_{BDO} \cdot C_{2,3BD} \quad [6.22]$$

De manera análoga al desarrollo seguido con las células en crecimiento, se ha procedido al ajuste del modelo cinético de manera simultánea para los distintos experimentos realizados en *batch* con diferentes concentraciones iniciales de glicerina pura (45, 70, 125 y 210 g/L, correspondientes a los experimentos denominados Z1 a Z4 en el Capítulo 5). Así mismo se ha realizado el ajuste del modelo a los datos experimentales cuando se emplea glicerol crudo como sustrato carbonado, en concentración inicial de 210 g/L, correspondiente al ensayo Z6 del mismo Capítulo. En la Tabla 6.4 se muestra el resultado de los valores óptimos de los parámetros cinéticos en cada caso así como el error del ajuste de los mismos. Se puede observar que el modelo es capaz de simular los datos experimentales cuando no existe crecimiento celular. Cabe destacar que, en este caso, ni la naturaleza del sustrato carbonado (glicerol puro o crudo) ni su concentración inicial repercuten significativamente en el valor de los parámetros y que el valor de los mismos es similar al obtenido en el ajuste del modelo cuando se emplea glicerol puro con células en crecimiento (ver Tabla 6.2).

Tabla 6.4 Valores óptimos de los parámetros cinéticos empleados en el ajuste del modelo cinético a los datos experimentales de la fermentación en *batch* con células en estado de *resting cells* cuando se emplea glicerol puro y glicerol crudo como fuente de carbono.

PARÁMETROS CINÉTICOS	GLICERINA PURA	GLICEROL CRUDO
$k_{BDO} [g_{2,3BD}/(g_X \cdot L \cdot h)]$	$0,034 \pm 0,009$	$0,029 \pm 0,001$
$Y_{G/2,3BD} (g_G/ g_{2,3BD})$	$2,52 \pm 0,07$	$2,47 \pm 0,11$

En la Figura 6.3 se muestra la comparación de la evolución de la concentración de glicerina y el 2,3-BD experimental y la predicha por el modelo en los experimentos realizados con glicerina pura y cruda cuando se emplean células en estado de *resting cells*. Como puede observarse, la tendencia observada es completamente fiel a la evolución experimental de ambas variables. Atendiendo a los parámetros estadísticos de los ajustes mostrados en la Tabla 6.5, se puede concluir que el modelo cinético empleado también es válido para los experimentos realizados en *resting cells*.

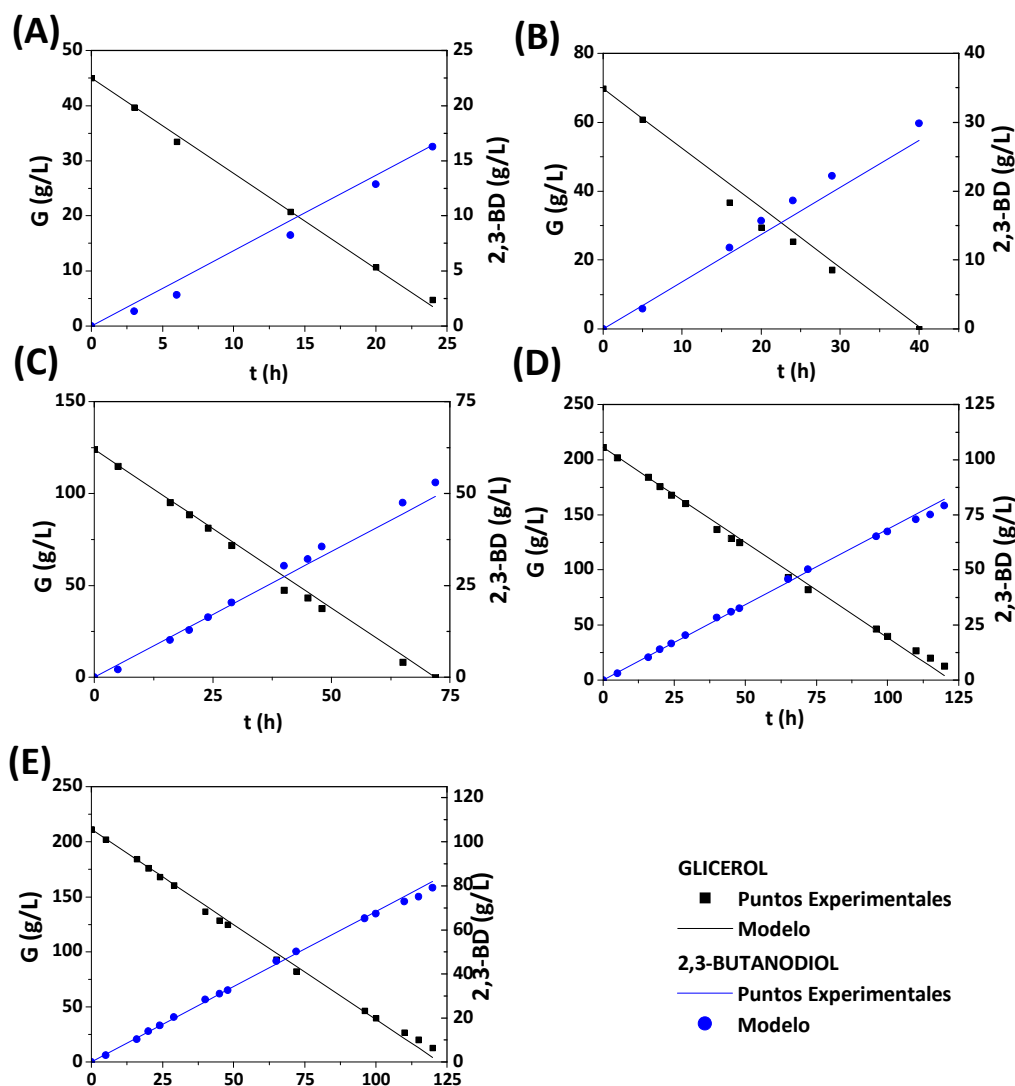


Figura 6.3 Comparación de la evolución de los valores experimentales de la concentración de glicerol y 2,3-BD y los simulados por el modelo cuando se emplea un biocatalizador en estado de *resting cells*, para los experimentos con glicerina pura y concentración inicial (A) 45 g/L, (B) 70 g/L, (C) 125 g/L y (D) 210 g/L y glicerina cruda y concentración inicial (E) 210 g/L.

Figura 6.5 Parámetros estadísticos del ajuste del modelo a los datos experimentales de las fermentaciones en batch con células en resting cells cuando se emplea glicerol puro y glicerol crudo como fuente de carbono.

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	GLICERINA PURA	GLICEROL CRUDO
ERMC	2,70	4,11
F-Fisher	$2,75 \cdot 10^4$	$9,43 \cdot 10^3$
SRC	58,3	64,2
VE (%)	99,6	99,4

6.4 SIMULACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS EN *FED-BATCH* CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO

Por último, se ha realizado una simulación del comportamiento del sistema empleando células en estado de crecimiento en una operación en *fed-batch*. Para ello se han empleado el valor óptimo de los parámetros del modelo cinético cuando se emplea glicerina pura y glicerol crudo, simulando el perfil de adición de glicerina desarrollado en el Capítulo 4 que conduce a mayor concentración de 2,3-BD en cada caso (experimentos G7 y G3, respectivamente).

En la Figura 6.4 se observa la evolución de la concentración para cada uno de los compuestos contemplados en el modelo cinético (biomasa, glicerol, 2,3-BD, acetoína y el pseudocompuesto subproducto). Como puede observarse, la reproducción obtenida cuando se emplea glicerina pura (Figuras A y B) no simula correctamente la tendencia observada, prediciendo una producción mayor que la experimental de 2,3-BD y un consumo de sustrato más rápido a partir del primer pulso de alimentación de glicerina. La simulación obtenida para la concentración de biomasa, acetoína y subproducto sí es aproximada a los valores experimentales.

En el caso de la operación en *fed-batch* empleando glicerol crudo (Figuras C y D), la evolución predicha por el modelo cinético reproduce las tendencias experimentales observadas. Si bien la tendencia del modelo en la producción de 2,3-BD y el consumo de glicerol se separa ligeramente de los puntos experimentales, esta diferencia se encuentra dentro del error del valor óptimo del parámetro, como muestran las líneas discontinuas de las figuras.

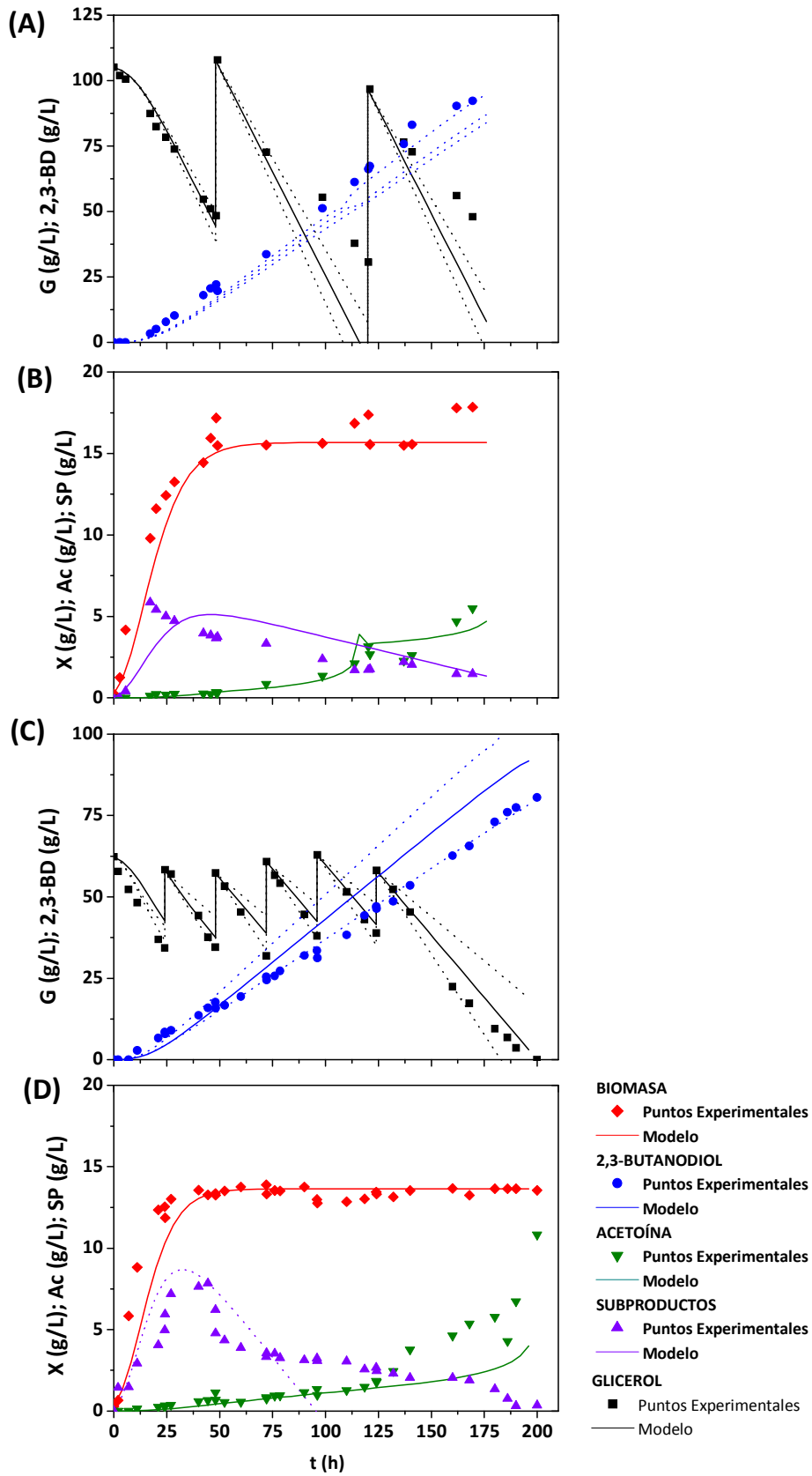


Figura 6.4 Simulación del modelo cinético con células en crecimiento para los experimentos en fed-batch empleando glicerol puro (A y B) y empleando glicerol crudo (C y D).

Como se ha comentado, la desviación del modelo cinético respecto a los puntos experimentales cuando se emplea glicerina pura como sustrato carbonado procede principalmente de la diferencia entre la velocidad de consumo de sustrato predicha por el modelo y la observada experimentalmente. Para corregir esta desviación se plantea la hipótesis de que el error de ésta deriva de la suposición en el modelo cinético de que el rendimiento de glicerol a 2,3-BD ($Y_{G/2,3-BD}$) es constante a lo largo de toda la fermentación. Como se ha comentado anteriormente, este parámetro no es un parámetro puramente estequiométrico, sino que determina el flujo metabólico de sustrato a producto y el valor de éste puede ser diferente en cada etapa de la fermentación, de la misma manera que la distribución de productos va cambiando en función de las condiciones de aireación, pH y estado metabólico del biocatalizador. Para realizar nuevamente la simulación del proceso, se ha calculado el rendimiento experimental en cada pulso de glicerina pura, teniendo en cuenta la cantidad de sustrato consumido y producto producido en cada intervalo entre pulsos, llegando a valores diferentes para cada adición de sustrato (2,55, 1,82 y 1,51, para la primera etapa, tras la primera adición de glicerina a la producción en curso y después de la segunda, respectivamente). Estos resultados sugieren que el glicerol se usa de manera cada vez más eficiente, necesitándose menor cantidad de este por gramo de 2,3-butanodiol. Esto, sin embargo, no significa una mayor velocidad de producción del diol, sino la ausencia de reacciones hacia otros productos.

En la Figura 6.5 se ha representado la simulación del *fed-batch* empleando células en crecimiento y glicerina pura como sustrato carbonado con el modelo cinético desarrollado modificando el rendimiento de glicerina a 2,3-BD en cada pulso. Como puede observarse, la reproducción de la operación mediante esta estrategia mejora respecto al modelo cinético anterior.

Para concluir, cabe destacar que el modelo cinético propuesto es fiel a las tendencias experimentales observadas, tal y como avalan los parámetros estadísticos de cada ajuste, tanto para el sistema con células en crecimiento como para células en estado de *resting cells*, empleando ajustes múltiples para el caso de los experimentos en *batch* con glicerina pura y ajustes independientes para el empleo de glicerina cruda. En cuando a la simulación del comportamiento del sistema en *fed-batch*, en líneas generales la predicción realizada a partir del valor de los parámetros cinéticos determinados en los ajustes anteriores en *batch* es buena para todos los compuestos a excepción del glicerol. La modificación del modelo a través de la variación del coeficiente $Y_{G/2,3BD}$, como reflejo de la focalización del metabolismo hacia la

producción de 2,3-BD a lo largo de la operación, mejora la tendencia del modelo teórico frente a los datos experimentales.

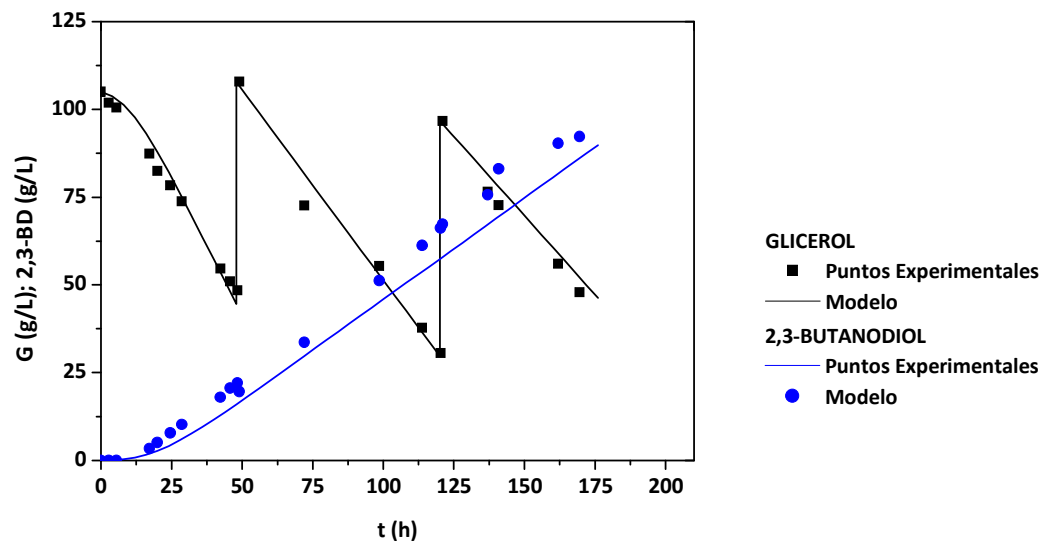


Figura 6.5 Simulación del modelo cinético con células en crecimiento para los experimentos en fed-batch empleando glicerol puro teniendo en cuenta la variación del rendimiento de glicerol a 2,3-BD durante el ensayo.

6.5 BIBLIOGRAFÍA

Almquist, J.; Cvijovic, M.; Hatzimanikatis, V.; Nielsen, J. y Jirstrand, M (2014). Kinetic models in industrial biotechnology- Improving cell factory performance. *Metabolic Engineering*, 24: 38-60.

Celinska, W. y Grajek, W. (2009).Biotechnological production of 2,3-butanediol – Current state and prospects. *Biotechnology Advances*, 27: 715–725.

García-Ochoa, F.; Romero, A. y Santos, V.E. (1992). Comparison of methods for determining the kinetic parameters in complex reactions. *International Chemical Engineering*, 32: 538-551.

García-Ochoa, F. y Romero, A. (1993). Kinetic modelling of reaction networks. *Trends of Chemical Engineering*, 1: 285-305.

Ji, X.; Huang, H. y Ouyang, P. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: A state of the art review. *Biotechnology Advances*, 29: 351 –364.

Nielsen, J. y Villadsen, J. (1992). Modelling of microbial kinetics. *Chemical Engineering Science*, 47: 4225-4270.

Weekman, V. M. (1968). A model of catalytic cracking conversion in fixed, moving and fluid-bed reactors. *Industrial & Engineering Chemistry Research and Development*, 7: 90-95.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN

La crisis energética y medioambiental actual derivada del empleo de combustibles fósiles ha inducido un progresivo cambio de paradigma en el modelo energético, buscando una mayor sostenibilidad a través del desarrollo de combustibles renovables. Potenciado por el marco legislativo, el biodiésel se erige en Europa como biocombustible más atractivo, con una producción creciente desde hace más de una década.

El biodiésel se genera mediante la reacción de transesterificación de los triglicéridos presentes en aceites vegetales o grasas animales, con la ineludible generación de glicerina como subproducto de dicha reacción. El auge de este biocombustible ha conllevado la saturación del mercado de la glicerina y, como consecuencia, la caída del precio de la misma, pasando a ser considerada un residuo en esta industria.

La metodología de integración en las biorrefinerías aparece como un concepto análogo al de refinería convencional y apuesta por el aprovechamiento completo de la materia prima para la obtención no únicamente de biocombustible, sino también de energía, productos químicos y biomateriales. Desde este enfoque, el desarrollo de nuevas vías de revalorización de la glicerina ha adquirido gran interés tanto dentro de la comunidad científica como en el sector industrial. Las particularidades de la reactividad química como el papel biológico de la glicerina hacen posible su revalorización tanto por vía química como biotecnológica.

Dentro del amplio espectro de productos químicos derivados de la glicerina aparece el 2,3-butanodiol (2,3-BD), compuesto implicado en la síntesis de numerosos productos de valor añadido apreciable, como la metiletilcetona y el butadieno. Si bien la síntesis fermentativa del 2,3-BD ha sido ampliamente estudiada empleando sustratos carbonados de diferente naturaleza, el estudio de la producción de 2,3-BD a partir de glicerina por vía biotecnológica destaca por la novedad del mismo, que se traduce en la gran escasez de trabajos pretéritos publicados sobre el proceso.

El trabajo abordado en la presente Memoria se enmarca dentro de la ERA-Net europea ERA-IB a través del proyecto “*Production and Upgrading of 2,3-Butanediol from Biomass*” (PUBB), enfocado en el desarrollo y escalado de fermentaciones eficientes para producir 2,3-BD empleando materias primas renovables de bajo coste. El objeto de este trabajo es el desarrollo del proceso de producción de 2,3-BD a partir de glicerol por vía biotecnológica, siguiendo la metodología para el desarrollo de bioprocesos del Grupo de Investigación *Fisicoquímica de Procesos Industriales y Medioambientales* (FQPIMA), del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid. La aplicación de la citada metodología al proceso objeto de esta Tesis Doctoral ha conllevado las etapas que se detallan a continuación.

1 Selección del biocatalizador

Para la selección de un biocatalizador no patógeno para el proceso fue necesaria la colaboración con la empresa española de biotecnología Biopolis, S. L., que identificó el género *Raoultella* como potencialmente productor de 2,3-BD, conclusión obtenida después de evaluar en un amplio *screening* casi un millar de cepas. En el proceso de selección del biocatalizador se ha evaluado la capacidad y eficacia para producir 2,3-BD a partir de glicerina pura y glicerol crudo de dos cepas inéditas hasta ahora: *R. terrigena* CECT 4519 y *R. planticola* CECT 843.

Para cada cepa se ha llevado a cabo la estandarización de los protocolos de mantenimiento y conservación del microorganismo así como de crecimiento del inóculo, debido a su influencia determinante en el éxito de proceso. Posteriormente, a través de la metodología Taguchi para el diseño de experimentos, se ha determinado la influencia relativa en el proceso de la temperatura de operación, la concentración inicial de extracto de levadura y el posible efecto positivo de la adición de ácidos orgánicos en la producción de 2,3-BD. Se ha llegado a la conclusión de que ambas cepas son eficientes en la biotransformación de la glicerina en el producto de interés. Si bien la fermentación catalizada por *R. terrigena* conduce a un menor tiempo de operación, criterio determinante en la selección del biocatalizador.

2 Estudio del estado del biocatalizador

Atendiendo a la posibilidad de replicación celular, se distinguen dos estados del biocatalizador posibles para un bioproceso: estado de crecimiento y estado de reposo o *resting cells*. La diferencia entre ambos radica en la composición del medio en el que se encuentran suspendidas las células, que favorece o impide la duplicación celular y, por

tanto, dirige el metabolismo que controla el transcurso de la operación de manera diferente.

Debido a las peculiaridades de cada estado celular, en el presente trabajo se ha evaluado la posibilidad de emplear un biocatalizador compuesto tanto por células en estado de crecimiento como en estado de *resting cells*. Para cada uno de los biocatalizadores se ha profundizado en la influencia de las condiciones de operación para la determinación de los valores óptimos en cada caso.

3 Estudio de las condiciones de operación

El punto de partida para el estudio de las condiciones de operación es la identificación de las variables de mayor influencia en el proceso. Fruto de la revisión bibliográfica realizada para ilustrar el Estado del Arte de la producción biotecnológica de 2,3-BD, se ha identificado el pH y la disponibilidad de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo como variables clave del metabolismo fermentativo.

Independientemente del estado del biocatalizador empleado, la producción de 2,3-BD está favorecida por pH ligeramente ácido, en el intervalo de pH comprendido entre 5,0 y 6,0. Si bien, para maximizar la producción de 2,3-BD empleando células en crecimiento, se ha definido un perfil de pH (evolución libre de pH neutro a pH ácido -5,5- y posterior control en dicho valor), cuando la operación se lleva a cabo con células en estado de *resting cells* es necesario controlar el pH durante toda la operación en el pH óptimo de producción (5,5).

Tras el estudio de la influencia de las condiciones hidrodinámicas, se determinó que la velocidad de agitación óptima en cada caso para maximizar la producción de 2,3-BD (325 rpm empleando células en crecimiento y 400 rpm empleando células en estado de *resting cells*). En estas condiciones, la concentración de oxígeno disuelto permanece en cero durante toda la fermentación, concluyéndose que las condiciones microaerobias favorecen la producción de 2,3-BD. Resolviendo el balance de oxígeno, se determinó la velocidad de consumo de oxígeno (*OUR*) en cada caso: $6,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol}_{\text{O}_2}/(\text{L} \cdot \text{s})$ y $4,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol}_{\text{O}_2}/(\text{L} \cdot \text{s})$ para las células en crecimiento y en *resting cells*, respectivamente.

4 Estudio de la forma de operación

La forma de operación a través de la cual se lleva a cabo el bioproceso es determinante del éxito de la misma, cuya finalidad es alcanzar la máxima concentración de 2,3-BD.

Para evaluar la viabilidad y limitaciones de cada forma, se ha estudiado la posibilidad de llevar a cabo la operación en discontinuo (*batch*) con diferentes concentraciones iniciales de sustrato así como en semicontinuo (*fed-batch*) con diferentes perfiles de alimentación de glicerina.

Del estudio del proceso en *batch* empleando células en estado de crecimiento se observa la existencia de fenómenos de inhibición por sustrato para concentraciones iniciales de glicerina superiores a 140 g/L, por lo que se apostó por el desarrollo de la operación en *fed-batch* empleando tanto glicerina pura como glicerina cruda. Para el sustrato puro, la concentración de 2,3-BD alcanzada fue 90,5 g/L, con un rendimiento respecto al máximo teórico del 87,9% y una productividad de 0,52 g/(L·h). Para el residuo, se obtuvieron 80,5 g/L de 2,3-BD, con un rendimiento respecto al máximo teórico del 90% y una productividad de 0,40 g/(L·h).

El empleo de un biocatalizador compuesto por células en estado de *resting cells* elimina los problemas de inhibición por sustrato presentes en el sistema en crecimiento, como se extrajo del estudio de la influencia de concentración inicial de glicerina en este sistema. En una operación en *batch* empleando una concentración inicial de glicerina pura de 210 g/L se obtuvieron 82 g/L de 2,3-BD, correspondientes al 79,4% de rendimiento respecto al máximo teórico, con productividad de 0,63 g/(L·h). El empleo de glicerol crudo en las mismas condiciones condujo a una producción de 76,5 g/L, con un rendimiento respecto al máximo teórico de 77,2% y una productividad de 0,51 g/(L·h).

5 Formulación de un modelo cinético

Para la descripción cinética del proceso se ha propuesto un modelo que tiene en cuenta la evolución de la concentración de biomasa, glicerina, 2,3-BD, acetoína y el pseudocomponente subproductos. Este pseudocomponente ha sido definido aplicando la teoría de *lumping*, correspondiendo con la suma de los subproductos presentes en el caldo de cultivo: ácido acético, ácido láctico y etanol. Se ha propuesto una ecuación cinética empírica que determina la velocidad de reacción de cada una de las reacciones implicadas en la red de reacciones formulada, teniendo en cuenta el conocimiento del sistema adquirido en los estudios anteriores.

Para el cálculo de los parámetros cinéticos se ha aplicado el método integral, que permite minimizar el error del ajuste cuando se poseen datos integrales, como son los determinados experimentalmente en esta Tesis (concentración vs. tiempo). Para su

cálculo es necesario el acople de un algoritmo de integración numérica (método implícito de Euler con paso variable) y un algoritmo de ajuste estadístico (no lineal con minimización de la suma de residuos al cuadrado), para lo cual se ha empleado el programa de modelización matemática, simulación y optimización de procesos *Aspen Custom Modeler*[®].

El valor de los parámetros cinéticos se ha determinado mediante ajuste múltiple respuesta del modelo a los datos experimentales, tanto para el sistema con células en crecimiento como en estado de *resting cells*. En ambos casos, ha sido posible el ajuste simultáneo de diferentes experimentos empleando glicerina pura como sustrato. El ajuste del modelo a los datos experimentales cuando se emplea glicerol crudo como sustrato ha sido llevado a cabo de manera individual. Avalados por los parámetros estadísticos del ajuste, el modelo cinético propuesto ajusta perfectamente con las tendencias observadas experimentalmente.

Por último, empleando el modelo determinado a partir de los experimentos en *batch*, se llevó a cabo la simulación de la evolución de los compuestos para los experimentos en *fed-batch* llevados a cabo tanto con glicerina pura como cruda, empleando el valor de los parámetros cinéticos obtenidos en los ajustes en *batch*. Debido a la desviación del perfil de concentración de glicerina predicho por el modelo respecto del que presentan los puntos experimentales cuando se emplea glicerina pura, se propuso un modelo cinético que tuviera en cuenta la variación de coeficiente de rendimiento de glicerol a 2,3-BD, como reflejo del cambio del flujo metabólico de sustrato a producto en cada pulso de la fermentación, consiguiendo así mejorar la reproducción del modelo de las tendencias experimentales observadas.

Desde un punto de vista global, la investigación desarrollada en la presente Tesis Doctoral supone la profundización en un proceso de revalorización de la glicerina escasamente estudiado hasta el momento. Se consolida así una nueva vía de transformación del residuo del proceso de producción de biodiésel que contribuye a la integración en la biorrefinería mediante la producción de un compuesto químico de base con amplias aplicaciones: el 2,3-butanodiol. El rigor científico con el que se ha abordado la metodología para el desarrollo de bioprocesos ha conducido a conclusiones que constituyen un punto de partida sólido para el cambio de escala del proceso a nivel industrial.

CONCLUSIONES

En este Epígrafe se incluyen las principales conclusiones extraídas en la presente Tesis Doctoral.

Respecto a la elección del biocatalizador del proceso

- 1 El género bacteriano *Raoultella* presenta capacidad para transformar glicerina en 2,3-BD a través del metabolismo fermentativo de la ruta de ácidos mixtos.
- 2 Las cepas estudiadas en esta investigación, *Raoultella terrigena* CECT 4519 y *Raoultella planticola* CECT 843, no han sido descritas previamente en bibliografía y cumplen los requisitos en materia de seguridad biológica para su empleo como biocatalizadores de un proceso biotecnológico a nivel industrial.
- 3 El protocolo estandarizado de crecimiento del inóculo consta de dos etapas en serie de duración 8 h y 4 h en el caso de *R. planticola* y 7 h y 4 h en el caso de *R. terrigena*.
- 4 La variable de mayor influencia para ambos microorganismos en las funciones objetivo estudiadas es la concentración inicial de extracto de levadura.
- 5 Dentro del intervalo estudiado, la mayor concentración de extracto de levadura repercute en un mayor rendimiento y productividad, para ambos microorganismos.
- 6 Debido a las limitaciones económicas que impone el uso de fuentes de nitrógeno complejas, se ha fijado la concentración de extracto de levadura del medio de cultivo en 1,5 g/L.
- 7 La temperatura de operación que maximiza el rendimiento y productividad a 2,3-BD cuando se emplea *R. terrigena* es 30 °C.

- 8 La temperatura de operación que maximiza el rendimiento y productividad a 2,3-BD cuando se emplea *R. planticola* es 28 °C.
- 9 La adición de ácidos orgánicos para activar la ruta de síntesis del 2,3-BD no presenta una influencia muy acentuada en el intervalo de concentraciones estudiado.
- 10 Ninguna de las combinaciones de adición de ácidos orgánicos probadas han mejorado el proceso cuando se emplea *R. terrigena*.
- 11 La adición de ácido cítrico en concentración 0,42 g/L mejora ligeramente la producción cuando se emplea *R. planticola* como biocatalizador.
- 12 Tanto *R. planticola* como *R. terrigena* son eficientes como biocatalizador del proceso de producción de 2,3-BD a partir de glicerina, tanto pura como cruda.
- 13 Se ha seleccionado *R. terrigena* CECT 4519 como biocatalizador del bioproceso debido a la mayor productividad de esta cepa en comparación con *R. planticola* CECT 843.

Respecto a la producción de 2,3-BD empleando células de *R. terrigena* en estado de crecimiento

Respecto a la influencia del pH

- 14 El pH determina la distribución de productos de la ruta metabólica, estando la producción de 2,3-BD favorecida por pH ligeramente ácidos.
- 15 El control de pH desde el inicio de la fermentación conduce a etanol como producto principal, independientemente del valor al que se controle el pH en el intervalo de 5,5 a 7,0.
- 16 Cuando el pH evoluciona libremente, la mayor producción y selectividad del proceso se observa cuando el pH inicial comienza en pH neutro.
- 17 La producción de 2,3-BD únicamente tiene lugar para pH más ácidos que 6,0.
- 18 Se ha conseguido la mejora del proceso en términos de rendimiento y productividad mediante una estrategia de control de pH que consiste en una etapa inicial de fermentación que evoluciona sin control de pH desde pH neutro hasta pH 5,5, valor a partir del cual es mantenido mediante un control externo de pH.

Respecto a la influencia de las condiciones hidrodinámicas

- 19** Las condiciones hidrodinámicas en el biorreactor determinan el crecimiento bacteriano y la distribución de productos de la ruta metabólica, siendo necesarias condiciones de microaerobiosis para llevar a cabo la producción de 2,3-BD.
- 20** La influencia de la velocidad de agitación en el coeficiente volumétrico de transferencia de materia se puede predecir mediante la siguiente expresión en el biorreactor empleado:

$$k_L \cdot a \text{ (s}^{-1}\text{)} = 5,23 \cdot 10^{-5} \cdot N^{2,5}(\text{rpm})$$

- 21** El rendimiento a 2,3-BD es máximo en las siguientes condiciones:

- i. Velocidad de agitación de 325 rpm
- ii. Coeficiente volumétrico de transferencia de materia de $3,57 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.
- iii. Demanda de consumo de oxígeno de $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol}_{\text{O}_2}/(\text{L} \cdot \text{s})$.

Respecto a la forma de operación del proceso

- 22** La concentración inicial de glicerina repercute en el crecimiento bacteriano, tanto en la velocidad de crecimiento como en la concentración de biomasa máxima alcanzada.
- 23** El empleo de concentraciones iniciales de glicerina inferiores a 140 g/L no conduce a limitaciones por inhibición de sustrato, en términos de velocidad de producción de 2,3-BD y de consumo de glicerina.
- 24** El empleo de concentraciones iniciales de glicerina superiores a 140 g/L tiene repercusiones negativas en la conversión de glicerina, el rendimiento y la productividad a 2,3-BD.
- 25** Para el desarrollo del proceso en *fed-batch* la concentración de glicerina no puede ser superior a 140 g/L, independientemente del perfil de sustrato empleado para evitar problemas por inhibición de sustrato.
- 26** Las concentraciones de 2,3-BD alcanzadas en los distintos experimentos realizados en *fed-batch* son: 84,8, 90,5 y 93,3 g/L.
- 27** La velocidad de producción de 2,3-BD es independiente del perfil de alimentación de glicerina empleado.

- 28 Alrededor de 160 h de fermentación el proceso sufre una ralentización, fenómeno posiblemente relacionado con el envejecimiento del biocatalizador y su consecuente reducción de actividad.

Respecto al desarrollo de la operación empleando glicerina cruda como sustrato

- 29 Se ha confirmado la posibilidad de emplear glicerol crudo proveniente de una fábrica de producción de biodiésel como sustrato de la fermentación.
- 30 El empleo de glicerol crudo en operación en *batch* mejora la concentración final de 2,3-BD alcanzada y el rendimiento respecto al máximo teórico respecto al empleo de glicerina pura. Sin embargo conduce a una pequeña pérdida de productividad en el proceso.
- 31 El empleo de glicerol crudo en operación en *fed-batch* conduce a una pérdida de productividad, rendimiento y concentración máxima de 2,3-BD alcanzada, respecto a los resultados obtenidos con glicerina pura.
- 32 Los resultados obtenidos empleando glicerina cruda en operación en *fed-batch* en términos de y concentración máxima de 2,3-BD, rendimiento respecto al máximo teórico y productividad son los siguientes: 80,5 g/L, 90% y 0,40 g/(L·h).
- 33 Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se encuentran dentro del rango de los valores publicados por otros autores en bibliografía para el mismo bioproceso.
- 34 El proceso de producción de 2,3-BD empleando como biocatalizador células en crecimiento de *R. terrigena* CECT 4519 es viable y eficaz para la revalorización del residuo del proceso de producción de biodiésel.

Respecto a la producción de 2,3-BD empleando células en estado de *resting cells*

Respecto a la etapa de obtención del biocatalizador

- 35 Las condiciones de operación de la etapa de crecimiento del biocatalizador que conducen a la obtención de una biomasa eficaz en términos de concentración de 2,3-BD específica alcanzada y productividad a 2,3-BD específica son las siguientes: velocidad de agitación 250 rpm, caudal de aireación 1,5 vvm, concentración inicial de glicerina 30 g/L, tiempo de crecimiento 20 h.

- 36** La actividad del biocatalizador decrece con el tiempo de almacenamiento previo a su utilización.
- 37** El tiempo de almacenamiento del biocatalizador no debe ser superior a 1 día para mantener la eficacia de éste.

Respecto a la etapa de producción de 2,3-BD

- 38** De manera análoga a lo observado en el proceso con células en crecimiento, las variables de mayor influencia son el pH y la aireación.
- 39** Se observa una fuerte influencia de la concentración de biocatalizador.
- 40** El pH ácido, cercano a 5, favorece la producción de 2,3-BD.
- 41** El empleo de tampón citrato 50 mM y tampón fosfato 75 mM es igual de efectivo para el desarrollo de la operación.
- 42** Debido a la composición del glicerol crudo, caracterizado por un alto contenido en sales de fosfato, se selecciona tampón fosfato 75 mM como medio para el desarrollo de la operación en *resting cells*.
- 43** La concentración de biocatalizador que conduce a mejores resultados es 20 g/L., obteniéndose un rendimiento respecto al máximo teórico cercano a 0,60 y una productividad de 0,60 g/(L·h).
- 44** La influencia de la velocidad de agitación en el coeficiente volumétrico de transferencia de materia se muestra en la siguiente expresión,

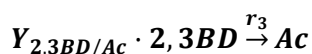
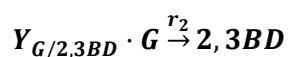
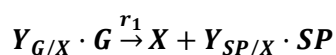
$$k_L \cdot a \text{ (s}^{-1}\text{)} = 5,93 \cdot 10^{-9} \cdot N^{2,5}(\text{rpm})$$

- 45** El rendimiento a 2,3-BD es máximo en las siguientes condiciones:
- i. Velocidad de agitación de 400 rpm
 - ii. Coeficiente volumétrico de transferencia de materia de $0,02 \text{ s}^{-1}$.
 - iii. Demanda de consumo de oxígeno de $4,24 \cdot 10^{-6} \text{ mol}_{\text{O}_2}/(\text{L} \cdot \text{s})$.
- 46** Cuando la transformación es catalizada por células en estado de *resting cells* el metabolismo bacteriano está dirigido casi exclusivamente a la producción de 2,3-BD.

- 47 La velocidad de producción de 2,3-BD es constante e independiente de la concentración inicial de sustrato aunque la concentración final alcanzada sí es proporcional a éste.
- 48 A partir de las 140 h de experimentación se observa una ralentización de la producción que puede estar ligada a fenómenos de agotamiento del poder reductor en el medio intracelular o de muerte celular.
- 49 La concentración máxima de glicerina para la cual se han obtenido resultados exitosos es 210 g/L, valor muy superior al que puede ser empleando cuando las células están creciendo.
- 50 Cuando se emplean 210 g/L de glicerina pura se obtienen 82 g/L de 2,3-BD, un rendimiento respecto al máximo teórico del 79,4% y productividad de 0,63 g/(L·h).
- 51 Cuando el proceso se lleva a cabo empleando glicerina cruda es posible llevar a cabo la operación en *resting cells* sin emplear ningún tampón biológico debido a la alta concentración de sales de fosfato contenidas en el residuo.
- 52 Cuando se emplean 210 g/L de glicerina cruda se obtienen 76,5 g/L de 2,3-BD, un rendimiento respecto al máximo teórico del 77,2% y productividad de 0,51 g/(L·h).
- 53 El proceso de producción de 2,3-BD empleando como biocatalizador células de *R. terrigena* CECT 4519 en estado de *resting cells* es viable y eficaz para la revalorización del residuo del proceso de producción de biodiésel.

Respecto a la formulación de un modelo cinético que describa el proceso

- 54 Se ha propuesto un modelo cinético que contempla la evolución de la biomasa (X), la glicerina (G), el 2,3-BD, la acetoína (Ac) y un pseudocompuesto denominado subproducto (SP) cuya concentración corresponde con la suma de las concentraciones de subproductos a cada tiempo.
- 55 La red de reacciones simplificada capaz de explicar los datos experimentales se muestra a continuación.



$SP \xrightarrow{r_4} \text{Energía}$

56 Las ecuaciones cinéticas de las citadas reacciones se muestran a continuación.

$$r_1(g_G/L \cdot h) = \mu \cdot C_X \cdot \left[1 - C_X/C_X^{m\acute{a}x} \right] \cdot e^{(pH-5,5)}$$

$$r_2(g_{2,3BD}/L \cdot h) = k_{BDO} \cdot C_X \cdot e^{k_{pH} \cdot (pH-5,5)}$$

$$r_3(g_{Ac}/L \cdot h) = k_{Ac} \cdot C_X/C_G$$

$$r_4(g^{SP}/L \cdot h) = m_s \cdot C_X$$

57 El modelo cinético global en forma de velocidades de producción de cada compuesto se muestra a continuación.

$$dC_X/dt(g_X/L \cdot h) = \mu \cdot C_X \cdot \left[1 - C_X/C_X^{m\acute{a}x} \right] \cdot e^{(pH-5,5)}$$

$$dC_G/dt(g_G/L \cdot h) = -Y_{G/X} \cdot \mu \cdot C_X \cdot \left[1 - C_X/C_X^{m\acute{a}x} \right] \cdot e^{(pH-5,5)} - Y_{G/2,3BD} \cdot k_{BDO} \cdot C_X \cdot e^{(pH-5,5)}$$

$$dC_{2,3BD}/dt(g_{2,3BD}/L \cdot h) = k_{BDO} \cdot C_{2,3BD} \cdot e^{(pH-5,5)} - Y_{2,3BD/Ac} \cdot k_{Ac} \cdot C_X/C_G$$

$$dC_{Ac}/dt(g_{Ac}/L \cdot h) = k_{Ac} \cdot C_X/C_G$$

$$dC_{SP}/dt(g^{SP}/L \cdot h) = -Y_{SP/X} \cdot \mu \cdot C_X \cdot \left[1 - C_X/C_X^{m\acute{a}x} \right] \cdot e^{(pH-5,5)} - m_s \cdot C_X$$

58 Los valores de los parámetros del modelo capaces de reproducir los experimentos empleando células en estado de crecimiento son:

PARÁMETROS CINÉTICOS	GLICERINA PURA	GLICEROL CRUDO
μ (h^{-1})	$0,101 \pm 0,006$	$0,122 \pm 0,006$
$C_X^{\text{máx}}$ (g_X/L)	$12,74 \pm 0,51$	$17,10 \pm 0,90$
k_{BDO} [$\text{g}_{2,3\text{BD}}/(\text{g}_X \cdot \text{L} \cdot \text{h})$]	$0,038 \pm 0,002$	$0,039 \pm 0,006$
k_{Ac} [$\text{g}_{\text{Ac}} \cdot \text{g}_G/(\text{g}_X \cdot \text{L} \cdot \text{h})$]	$0,056 \pm 0,030$	$0,048 \pm 0,006$
m_s [$\text{g}_{\text{SP}}/(\text{g}_X \cdot \text{L} \cdot \text{h})$]	$0,0020 \pm 0,0018$	$0,0012 \pm 0,006$
$Y_{G/X}$ (g_G/g_X)	$1,15 \pm 0,19$	$1,34 \pm 0,19$
$Y_{G/2,3\text{BD}}$ ($\text{g}_G/\text{g}_{2,3\text{BD}}$)	$2,66 \pm 0,19$	$1,40 \pm 0,20$
$Y_{2,3\text{BD}/\text{Ac}}$ ($\text{g}_{2,3\text{BD}}/\text{g}_{\text{Ac}}$)	$1,12 \pm 1,10$	$1,38 \pm 1,13$
$Y_{\text{SP}/X}$ ($\text{g}_{\text{SP}}/\text{g}_X$)	$0,41 \pm 0,09$	$0,94 \pm 0,12$

16 Los valores de los parámetros para el caso de células en estado de *resting cells* son similares a los obtenidos en el sistema con células en crecimiento:

PARÁMETROS CINÉTICOS	GLICERINA PURA	GLICEROL CRUDO
k_{BDO} [$\text{g}_{2,3\text{BD}}/(\text{g}_X \cdot \text{L} \cdot \text{h})$]	$0,034 \pm 0,009$	$0,029 \pm 0,001$
$Y_{G/2,3\text{BD}}$ ($\text{g}_G/\text{g}_{2,3\text{BD}}$)	$2,52 \pm 0,07$	$2,47 \pm 0,11$

59 El modelo cinético propuesto reproduce con gran fiabilidad la evolución de los compuestos implicados cuando la operación tiene lugar en *batch*.

60 El modelo cinético obtenido a partir de experimentos en *batch* para células en crecimiento reproduce considerablemente bien la evolución de las especies en operación en *fed-batch*, a excepción de la evolución de la concentración de glicerina.

61 El microorganismo sufre cambios metabólicos durante el transcurso de la operación en *fed-batch* cuando se emplean células en estado de crecimiento, que se traducen en cambios en la distribución de los flujos metabólicos.

62 La modificación del parámetro de rendimiento de glicerol a 2,3-BD ($Y_{G/2,3\text{BD}}$) mejora la simulación del proceso en *fed-batch*.

NOMENCLATURA

1,3-PD	1,3-propanediol.
2,3-BD	2,3-butanodiol.
a	Área interfacial específica (m^{-1}).
C_i	Concentración del compuesto i (g/L).
D	Diámetro del tanque (m).
db	Diámetro de burbuja (m).
DHA	Dihidroxiacetona.
D_L	Difusividad en el líquido (m^2/s).
ERMC	Error Residual Medio al Cuadrado, definido en la ecuación [2.11].
F-Fisher	Parámetro estadístico definido en la ecuación [2.12].
g	Constante de gravitación (m/s^2).
k_{Ac}	Constante cinética de la ecuación de síntesis de la acetoína, definida en la ecuación [6.9] [$g_{Ac} \cdot g_G / (g_X \cdot L \cdot h)$].
k_{BDO}	Constante cinética de la ecuación de consumo de glicerol para la producción de 2,3-butanodiol, definida en la ecuación [6.8] [$g_{2,3BD} / (g_X \cdot L \cdot h)$].
k_L	Coeficiente de transferencia de materia (m/s).
$k_L \cdot a$	Coeficiente volumétrico de transferencia de materia (s^{-1}).
m_s	Constante cinética de la ecuación de obtención de energía para el mantenimiento celular, definida en la ecuación [6.10] [$g_{SP} / (g_X \cdot L \cdot h)$].

N	Velocidad de agitación (rpm)
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada).
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida).
N _p	Número adimensional de potencia.
OTR	Velocidad de transferencia de oxígeno [mol _{O2} /(L·s)].
OUR	Velocidad de consumo de oxígeno [mol _{O2} /(L·s)].
P _i	Productividad del compuesto i [g/(L·h)].
PTT	Politrimetileno.
Q	Caudal de gas (L/min).
r _n	Velocidad de la reacción n [g/(L·h)].
R _j	Velocidad de producción del compuesto j [g/(L·h)].
RSR	Relación Señal Ruido.
S _i	Selectividad del compuesto i (g/g).
SRC	Suma de Residuos al Cuadrado, definido en la ecuación [2.10]
t _{almacenamiento}	Tiempo de almacenamiento del biocatalizador (d).
t _R	Tiempo de retención característico de cada compuesto para el método de empleado en HPLC (min).
T	Diámetro del agitador (m).
V	Volumen (L).
V _{AIRE}	Volumen de aire (%), referente al volumen que ocupa la cámara de gas respecto al volumen total de la botella empleada como dispositivo experimental.
VE	Porcentaje de la variación explicada (%), definido en la ecuación [2.13].
V _s	Velocidad superficial del gas (m/s).
YE	Concentración de extracto de levadura (g/L).

X	Conversión del sustrato (%).
$Y_{2,3\text{-BD}/Ac}$	Rendimiento macroscópico de 2,3-butanodiol a acetoína (g/g).
$Y_{G/2,3\text{-BD}}$	Rendimiento macroscópico de glicerol a 2,3-butanodiol (g/g).
$Y_{G/X}$	Rendimiento macroscópico de glicerol a biomasa (g/g).
Y_i	Rendimiento del compuesto i respecto a la concentración inicial de sustrato (g/g).
Y_i^*	Rendimiento del compuesto i respecto a la concentración consumida de sustrato (g/g).
$Y_{SP/X}$	Rendimiento macroscópico de subproductos a biomasa (g/g).

LETRAS GRIEGAS

η	Rendimiento respecto al máximo rendimiento teórico.
ρ_L	Densidad del líquido (kg/m ³).
ρ_G	Densidad del gas (kg/m ³).
σ	Tensión superficial (N/m).
ϕ	Fracción volumétrica de gas en el líquido (hold-up) (-).
μ	Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹).
μ_L	Viscosidad del líquido [kg/(m·s)].
μ_G	Viscosidad del gas [kg/(m·s)].

SUBÍNDICES

2,3-BD	Relativo al 2,3-butanediol.
A	Relativo al ácido acético.
Ac	Relativo a la acetoína.
C	Relativo al ácido cítrico.
E	Relativo al etanol.

G	Relativo al glicerol.
L	Relativo al ácido láctico.
O ₂	Relativo al oxígeno.
SP	Relativo al pseudocomponente “subproducto”.
t	Tiempo t.
X	Relativo a la biomasa.

SUPER ÍNDICES

*	Relativo a la saturación.
*	Relativo a la cantidad de sustrato consumido.
0	Referido al tiempo cero, valor inicial.
t	Referido al tiempo t.
esp	Referido en relación a la concentración de biomasa.
exp	Referido al valor experimental.
max	Referido al valor máximo.
teo	Referido al valor teórico.

ANEXOS

ANEXO I. RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL CAPÍTULO 3

Tabla I.1 Concentración de los metabolitos detectados en el caldo de cultivo en los distintos experimentos realizados en el estudio preliminar de la disponibilidad de oxígeno a las 24 h de experimentación (A1 a A11).

EXPERIMENTO	V _{AIRE} (%)	C _{2,3-BD} (g/L)	C _A (g/L)	C _L (g/L)	C _E (g/L)
A1	18,7	0,00	0,21	0,37	0,64
A2	35,0	0,00	0,24	0,47	0,61
A3	51,2	0,00	0,27	0,80	0,53
A4	63,7	0,00	0,26	1,12	0,47
A5	67,5	0,00	0,28	1,19	0,43
A6	71,0	0,00	0,32	1,46	0,45
A7	78,2	0,00	0,46	1,32	0,43
A8	83,7	0,00	0,96	0,88	0,32
A9	85,5	0,13	0,95	0,37	0,36
A10	92,7	0,33	1,58	0,00	0,29
A11	100,0	0,68	1,73	0,00	0,25

Tabla I.2 Resultados experimentales obtenidos en los ensayos realizados empleando distintos medios de cultivo sintéticos (A12 a A14).

EXPERIMENTO	t (h)	C _X (g/L)	pH	C _G (g/L)	C _{2,3-BD} (g/L)	C _{ac} (g/L)	C _L (g/L)	C _A (g/L)	C _E (g/L)
A12	0	0,25	7,0	35,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	0,54	6,0	30,24	0,00	0,00	1,54	0,00	0,68
	6	0,89	5,3	28,54	0,06	0,08	2,54	0,00	1,44
	10	2,05	4,7	25,54	0,17	0,15	5,65	0,19	1,68
	16	2,29	4,0	24,38	0,63	0,26	6,78	0,44	1,75
	27	2,16	3,7	18,68	1,85	0,53	5,71	1,28	1,63
	41	2,25	4,1	17,21	2,65	0,91	3,54	2,09	1,49
	50	2,24	4,0	15,05	2,91	1,22	2,17	2,47	1,25

[Continuación] **Tabla I.2** Resultados experimentales obtenidos en los ensayos realizados empleando distintos medios de cultivo sintéticos (A12 a A14).

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
A13	0	0,25	7,0	31,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	0,89	6,5	28,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,54
	6	1,54	6,1	26,64	0,90	0,00	0,00	0,00	0,65
	10	2,54	5,2	22,76	2,18	0,00	0,08	0,00	1,14
	16	2,64	5,0	18,19	2,83	0,14	0,18	0,07	1,19
	27	2,63	5,0	12,49	3,83	0,31	0,00	0,31	1,15
	41	2,95	4,8	4,92	4,36	0,92	0,00	0,41	1,00
	50	3,38	4,9	2,35	4,75	0,99	0,00	0,49	0,93
A14	0	0,30	7,0	33,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	2,36	5,7	29,64	0,00	0,00	0,07	0,25	0,00
	6	3,45	5,4	27,85	0,00	0,00	0,07	0,31	0,21
	10	4,92	5,2	26,01	0,00	0,00	0,07	0,34	0,44
	18	6,18	5,0	22,18	1,29	0,29	0,05	0,41	0,70
	27	7,40	4,8	19,04	2,23	0,79	0,00	0,44	1,01
	42	7,17	4,6	17,24	3,01	0,97	0,00	1,02	0,53
	50	7,12	4,5	15,06	3,45	1,20	0,00	1,08	0,46
A15	0	0,25	7,0	32,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,66	7,0	31,50	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00
	5	2,56	6,6	27,90	0,00	0,00	1,05	0,18	1,42
	8	4,87	5,8	23,45	0,00	0,00	2,36	0,00	3,16
	15	5,93	5,5	14,98	0,95	0,10	5,00	0,18	3,87
	18	6,41	5,5	12,29	2,21	0,22	4,17	0,54	3,87
	23	6,89	5,5	7,94	3,63	0,31	2,70	1,02	4,54
	26	7,52	5,4	4,79	4,67	0,40	1,47	1,31	4,78
	30	7,83	5,0	0,00	6,37	1,21	0,00	2,03	4,03

Tabla I.3 Resultados experimentales obtenidos para la evolución de la concentración de biomasa para las etapas previas de crecimiento del biocatalizador (experimentos A16 a A19).

EXPERIMENTO	A16	A17	EXPERIMENTO	A18	A19
t	C _x	C _x	t	C _x	C _x
(h)	(g/L)	(g/L)	(h)	(g/L)	(g/L)
0	0,12	0,25	0	0,11	0,23
1	0,11	0,27	1	0,12	0,35
2	0,10	0,48	3	0,13	0,53
3	0,16	1,13	4	0,16	2,81
4	0,26	2,58	4	0,26	4,25
5	0,44	3,39	6	1,19	7,94
6	0,82	4,09	7	3,04	8,62
7	1,70	4,29	8	7,21	8,94
8	2,79	4,35	9	8,51	9,12
9	3,64	4,41	11	9,61	9,24
10	3,93	4,39	12	9,85	-
11	4,26	-	14	9,76	-
12	4,30	-	16	9,54	-
14	4,32	-	-	-	-
16	4,41	-	-	-	-

Tabla I.4 Datos experimentales de rendimiento (y_1) y productividad de 2,3-BD (y_2) obtenidos al final de cada experimento planteado según el arreglo ortogonal L_{16} de la metodología Taguchi así como en el experimento de confirmación cuando se emplea como biocatalizador del proceso *R. planticola* (P1 a P17) y *R. terrigena* (T1 a T17).

EXPERIMENTO	Y _{2,3-BD} (g/g)	P _{2,3-BD} [g/(L·h)]	EXPERIMENTO	Y _{2,3-BD} (g/g)	P _{2,3-BD} [g/(L·h)]
P1	0,062	0,078	T1	0,082	0,089
P2	0,091	0,108	T2	0,104	0,120
P3	0,124	0,099	T3	0,138	0,136
P4	0,118	0,113	T4	0,167	0,142
P5	0,129	0,148	T5	0,101	0,128
P6	0,115	0,165	T6	0,126	0,136
P7	0,234	0,164	T7	0,157	0,198
P8	0,241	0,139	T8	0,152	0,145
P9	0,213	0,120	T9	0,173	0,176
P10	0,238	0,156	T10	0,190	0,200
P11	0,127	0,132	T11	0,143	0,108
P12	0,143	0,157	T12	0,148	0,175
P13	0,228	0,107	T13	0,178	0,194
P14	0,222	0,119	T14	0,154	0,165
P15	0,192	0,127	T15	0,136	0,140
P16	0,165	0,132	T16	0,092	0,075
P17	0,242	0,167	T17	0,194	0,212

Tabla I.5 Resultados experimentales obtenidos en los ensayos realizados empleando glicerina pura (P17) y distintas muestras de glicerina cruda (P18 y P19) cuando se utiliza *R. planticola* como biocatalizador.

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
P17	0	0,25	7,0	32,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,67	7,0	32,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	1,38	6,4	29,38	0,00	0,00	0,89	0,00	0,98
	8	2,08	5,9	27,03	0,00	0,00	3,77	0,00	1,83
	15	2,39	5,2	21,19	0,24	0,00	5,91	0,17	1,90
	18	2,40	5,1	19,98	0,27	0,33	4,87	0,62	1,79
	23	2,41	5,1	19,10	0,69	0,52	4,56	0,87	1,77
	26	2,48	5,2	17,85	1,17	0,70	4,31	1,10	1,67
	37	2,67	5,3	9,61	4,47	0,74	3,48	1,89	1,70
	42	2,33	5,2	5,02	5,89	1,21	2,76	2,25	1,81
	46	2,68	5,5	4,12	6,92	0,68	3,37	2,08	1,88
	49	2,22	5,2	1,43	8,52	1,38	2,42	2,27	1,70
	52	2,44	5,2	0,00	9,32	1,55	1,85	2,46	1,65
P18	0	0,25	6,8	38,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,70	6,8	37,03	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00
	5	1,82	6,3	34,65	0,00	0,00	0,78	0,33	1,43
	8	2,68	5,8	31,64	0,00	0,00	4,01	0,21	2,23
	15	3,03	5,0	24,93	0,29	0,00	6,00	0,00	2,63
	18	2,91	5,0	22,88	0,26	0,25	5,26	0,32	2,67
	23	2,86	5,0	22,17	0,66	0,51	4,77	0,54	2,47
	26	3,11	5,0	21,07	1,01	0,53	4,63	0,57	2,45
	37	3,38	5,1	13,66	3,63	0,76	4,34	1,19	2,45
	42	3,21	5,1	12,61	3,90	0,92	3,89	1,54	2,30
	46	3,05	5,1	12,90	4,83	1,26	3,40	1,62	2,09
	49	3,10	5,1	7,35	6,88	1,15	3,55	1,82	2,29
	63	3,77	5,5	0,76	10,05	1,61	2,64	2,38	2,09
	67	3,65	5,8	0,00	11,12	2,61	1,43	2,73	1,62

[Continuación] **Tabla I.5** Resultados experimentales obtenidos en los ensayos realizados empleando glicerina pura (P17) y distintas muestras de glicerina cruda (P18 y P19) cuando se utiliza *R. planticola* como biocatalizador.

EXPERIMENTO	t	C _x	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
P19	0	0,25	6,9	36,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,74	6,9	35,67	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00
	5	1,61	6,7	33,53	0,00	0,00	0,88	0,28	0,83
	8	2,33	6,0	29,54	0,00	0,00	3,58	0,15	1,53
	15	2,72	5,1	23,93	0,35	0,11	5,84	0,19	1,93
	18	2,86	5,0	23,21	0,50	0,30	5,35	0,37	2,03
	26	2,68	5,0	20,61	2,00	0,82	4,26	0,77	1,75
	37	2,87	5,1	13,36	4,52	1,05	4,19	1,24	1,87
	42	2,90	5,2	10,96	5,89	1,25	3,89	1,55	1,69
	46	2,70	5,1	12,22	6,35	1,30	3,99	1,50	1,71
	49	2,68	5,2	8,14	6,82	1,28	3,87	1,70	1,78
	63	4,00	6,0	0,00	10,64	2,08	0,81	2,05	1,66
	67	3,54	6,0	0,00	10,92	2,00	0,89	2,23	1,53

Tabla I.6 Resultados experimentales obtenidos en los ensayos realizados empleando glicerina pura (T17) y distintas muestras de glicerina cruda (T18 y T19) cuando se utiliza *R. terrigena* como biocatalizador.

EXPERIMENTO	t	C _x	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
T17	0	0,25	7,0	32,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,66	7,0	32,50	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00
	5	2,56	6,6	28,90	0,00	0,00	1,05	0,18	1,42
	8	4,87	5,8	23,45	0,00	0,00	2,36	0,00	3,16
	15	5,93	5,5	14,98	0,95	0,10	5,00	0,18	3,87
	18	6,41	5,5	12,29	2,21	0,22	4,17	0,54	3,87
	23	6,89	5,7	7,94	3,63	0,31	2,70	1,02	4,54
	26	7,52	5,8	4,79	4,67	0,40	1,47	1,31	4,78
	37	10,57	5,8	0,00	6,05	1,21	0,00	2,03	4,03

[Continuación] **Tabla I.6** Resultados experimentales obtenidos en los ensayos realizados empleando glicerina pura (T17) y distintas muestras de glicerina cruda (T18 y T19) cuando se utiliza *R. terrigena* como biocatalizador.

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
T18	0	0,25	6,8	38,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,74	6,8	36,84	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00
	5	3,25	6,2	32,98	0,00	0,00	0,69	0,25	2,06
	8	6,45	5,8	27,65	0,00	0,00	3,42	0,18	3,61
	15	7,98	5,3	18,97	0,99	0,00	4,89	0,00	4,02
	18	7,91	5,3	18,69	1,22	0,16	4,69	0,27	3,62
	23	8,21	5,4	15,22	2,72	0,45	3,69	0,76	3,57
	26	8,05	5,5	13,97	3,29	0,47	2,99	0,96	3,58
	37	9,83	5,8	5,36	6,80	0,38	0,72	1,30	4,01
	42	11,64	5,7	1,33	7,96	0,49	0,33	1,11	4,45
	46	11,64	5,6	1,29	7,12	0,90	0,00	2,00	3,99
	49	13,02	5,9	0,00	6,64	1,99	0,00	1,33	3,96
T19	0	0,25	6,9	36,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,78	6,8	35,59	0,00	0,00	0,18	0,15	0,00
	5	4,35	6,3	31,64	0,00	0,00	2,64	0,28	1,52
	8	6,87	5,9	26,54	0,00	0,00	4,77	0,19	2,68
	15	7,53	5,4	18,54	1,17	0,10	4,34	0,15	3,44
	18	7,16	5,4	16,64	2,14	0,24	3,15	0,34	3,62
	23	7,91	5,6	12,35	3,82	0,33	0,00	0,69	3,79
	37	11,01	5,7	0,51	7,99	0,84	0,00	1,65	4,20
	42	11,91	5,7	0,00	7,91	1,55	0,00	1,83	3,87
	46	10,99	6,0	0,00	8,03	1,76	0,00	1,29	3,52
	49	11,38	5,9	0,00	7,93	1,58	0,00	1,48	3,19

ANEXO II. RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL CAPÍTULO 4

Tabla II.1 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el estudio preliminar de la velocidad de agitación (B1 a B7).

EXPERIMENTO	t (h)	C _x (g/L)	pH	C _G (g/L)	C _{2,3-BD} (g/L)	C _{ac} (g/L)	C _A (g/L)	C _L (g/L)	C _E (g/L)
B1	0,0	0,30	6,9	32,00	0,00	0,00	0,00	Láctico	0,00
	2,5	1,89	6,9	30,90	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00
	5,0	3,47	6,8	29,34	0,00	0,00	0,55	0,00	0,76
	7,5	4,15	6,4	26,70	0,00	0,00	0,60	0,00	1,27
	10,5	4,67	6,3	24,90	0,08	0,00	0,50	0,00	1,83
	18,0	6,03	6,0	18,40	1,55	0,00	0,89	0,00	3,25
	22,0	6,25	5,9	15,24	2,24	0,15	1,20	0,05	3,57
	24,0	6,45	5,9	12,98	2,71	0,22	1,35	0,43	3,65
	27,5	6,50	5,8	9,87	3,19	0,28	1,68	0,75	3,70
	40,0	7,43	5,8	1,10	3,27	0,34	1,57	1,15	2,76
	41,0	7,65	5,7	0,00	3,47	0,40	1,45	1,25	2,26
B2	0,0	0,40	6,9	32,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,2	1,21	6,9	32,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,6	2,77	6,7	30,57	0,00	0,00	0,42	0,00	0,00
	5,2	4,50	6,5	28,90	0,00	0,00	0,48	0,00	0,96
	7,1	5,59	6,4	26,20	0,00	0,00	0,45	0,00	1,64
	10,5	6,83	6,2	22,30	0,30	0,00	0,28	0,00	2,48
	19,6	9,25	5,8	13,80	2,22	0,00	0,33	0,18	3,99
	21,9	9,93	5,8	9,25	2,99	0,15	0,59	0,74	3,75
	23,4	10,46	5,8	7,32	3,62	0,22	0,84	1,04	3,50
	25,9	11,25	5,8	4,76	4,26	0,28	1,12	1,40	3,20

[Continuación] **Tabla II.1** Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el estudio preliminar de la velocidad de agitación (B1 a B7).

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
B3	0,0	0,29	6,9	34,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,2	1,03	6,9	33,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,6	3,86	6,7	31,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5,2	7,17	6,6	28,00	0,00	0,00	0,28	0,00	0,88
	7,1	8,66	6,4	24,50	0,26	0,00	0,55	0,00	2,70
	10,5	10,20	6,2	20,30	0,93	0,00	0,50	0,00	3,67
	19,6	12,80	5,9	9,36	3,68	0,25	0,84	1,26	2,68
	21,9	14,03	5,8	6,87	4,36	0,32	1,02	1,41	2,50
	23,4	13,79	5,8	5,17	4,76	0,36	1,16	2,03	2,19
	25,9	13,60	5,9	3,13	5,06	0,54	1,41	2,41	1,98
B4	0,0	0,31	6,9	30,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,0	1,22	6,8	28,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4,0	4,68	6,5	26,38	0,00	0,00	0,14	0,37	0,13
	6,0	8,74	6,0	24,55	0,00	0,00	0,24	0,56	0,38
	8,0	10,29	5,8	21,18	0,47	0,00	0,22	0,70	0,65
	10,0	12,49	5,7	17,99	1,47	0,00	0,23	0,83	0,73
	12,0	12,81	5,6	16,33	2,26	0,11	0,17	0,82	0,62
	18,0	13,17	5,4	8,01	4,69	0,22	0,18	0,42	0,90
	20,0	12,87	5,3	6,41	5,08	0,26	0,23	0,24	0,92
	22,2	12,67	5,2	4,58	5,87	0,33	0,25	0,09	0,96
	25,0	12,20	5,0	2,61	5,95	0,57	0,37	0,00	0,96
	27,0	12,11	5,0	0,00	5,79	0,81	0,36	0,00	1,34

[Continuación] Tabla II.1 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el estudio preliminar de la velocidad de agitación (B1 a B7).

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
B5	0,0	0,33	7,0	31,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1,2	0,59	6,9	28,50	0,00	0,00	0,26	0,00	0,00
	3,5	2,40	6,7	26,49	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00
	5,1	3,47	6,2	23,07	0,00	0,00	0,42	0,16	0,27
	7,5	4,47	5,3	19,40	0,43	0,00	0,40	0,30	0,38
	10,5	5,65	5,3	17,03	1,41	0,00	0,38	0,20	0,43
	18,0	7,47	5,1	14,21	1,80	0,16	0,30	0,00	0,31
	21,7	7,83	4,8	8,33	2,87	0,34	0,28	0,00	0,39
	24,6	7,89	4,8	7,57	3,16	0,41	0,28	0,00	0,23
	27,6	8,21	4,7	7,06	3,55	0,39	0,36	0,00	0,30
	29,8	8,67	4,7	6,35	3,69	0,43	0,50	0,00	0,37
	33,0	8,75	4,7	6,22	3,89	0,40	0,56	0,00	0,38
B6	0,0	0,28	7,1	29,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,0	0,87	7,0	27,05	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00
	4,0	2,88	6,8	24,26	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00
	6,0	5,14	6,2	22,72	0,00	0,00	0,39	0,14	0,00
	8,0	6,58	5,7	20,38	0,24	0,00	0,45	0,31	0,00
	10,0	7,68	5,7	18,17	0,72	0,00	0,47	0,00	0,00
	12,0	9,06	5,6	17,50	0,94	0,15	0,59	0,00	0,00
	18,0	10,94	4,6	13,67	1,31	0,28	0,60	0,00	0,00
	20,0	11,06	4,5	13,38	1,43	0,32	0,63	0,00	0,00
	22,2	12,23	4,4	12,87	1,59	0,29	0,65	0,00	0,00
	25,0	12,02	4,3	12,23	1,69	0,33	0,70	0,00	0,00
	27,0	12,91	4,3	12,23	1,85	0,32	0,70	0,00	0,00

Tabla II.2 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el estudio de la influencia del pH (B7 a B10).

EXPERIMENTO	t	C _X	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
B7	0,0	0,43	29,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,0	1,99	28,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5,0	3,79	25,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,89
	10,0	7,89	13,54	1,25	0,00	0,00	0,00	2,35
	15,0	11,13	5,43	3,13	0,00	0,00	0,00	4,25
	18,0	12,27	1,76	4,02	0,16	0,00	0,22	5,40
	20,0	13,36	0,78	4,38	0,37	0,68	0,61	5,29
	22,0	13,91	0,00	3,61	1,00	0,78	0,71	4,87
B8	0,0	0,52	29,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,0	2,03	27,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5,0	3,77	24,54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,79
	10,0	8,13	14,84	0,79	0,00	0,00	0,00	2,14
	12,0	9,52	9,64	1,34	0,00	0,00	0,00	2,95
	18,0	12,53	2,80	2,79	0,00	0,87	0,41	5,34
	20,0	12,00	2,18	3,22	0,26	1,26	0,77	5,65
	22,0	12,31	1,22	3,10	0,34	1,46	1,30	5,25
	24,1	12,22	0,40	2,80	0,64	1,14	1,77	4,78
B9	0,0	0,54	30,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,0	1,02	30,32	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00
	4,0	2,91	28,68	0,00	0,00	0,00	0,38	0,00
	6,0	4,23	26,29	0,00	0,00	0,00	0,61	0,85
	8,5	6,65	19,11	0,18	0,00	0,00	0,45	1,27
	12,0	8,93	13,28	0,85	0,00	0,00	0,89	2,85
	15,0	10,04	8,67	1,78	0,00	0,78	1,24	3,63
	20,5	11,36	4,27	2,55	0,16	1,58	1,71	3,36
	23,0	11,82	1,89	2,28	0,28	2,08	2,37	2,99
	24,0	12,22	1,52	2,11	0,47	1,94	2,78	2,64

[Continuación] Tabla II.2 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el estudio de la influencia del pH (B7 a B10).

EXPERIMENTO	t	C _X	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
B10	0,0	0,40	30,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,0	1,05	29,95	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00
	4,0	3,00	28,46	0,00	0,00	0,00	0,44	0,00
	5,5	4,93	26,12	0,00	0,00	0,00	0,73	0,71
	7,0	6,20	24,68	0,00	0,00	0,00	0,91	1,20
	10,0	8,74	19,24	0,00	0,00	0,00	1,43	1,78
	15,0	11,53	13,06	0,69	0,00	0,89	2,21	3,22
	19,0	11,95	7,98	1,62	0,00	1,64	2,56	2,87
	21,6	12,42	4,05	1,40	0,21	2,08	3,44	2,44
	24,5	12,42	3,22	1,04	0,48	2,47	4,14	1,80
	26,5	13,42	3,08	1,04	0,51	1,53	4,50	1,47

Tabla II.3 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el estudio de la influencia del pH (B11 a B14).

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
B11	0,0	0,40	5,5	29,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,0	1,27	5,5	29,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4,0	3,55	5,5	28,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	6,0	5,09	5,1	26,02	0,24	0,00	0,00	0,00	0,44
	8,5	7,63	4,2	23,19	0,87	0,00	0,00	0,00	1,14
	12,5	9,35	3,8	19,76	1,64	0,15	0,00	0,00	1,39
	15,0	9,54	3,7	15,47	2,26	0,43	0,00	0,05	1,22
	20,5	10,02	3,6	12,67	2,64	0,53	0,00	0,46	1,12
	23,0	9,21	3,6	12,03	2,82	0,52	0,00	0,56	0,98

[Continuación] Tabla II.3 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el estudio de la influencia del pH (B11 a B14).

EXPERIMENTO	t	C _x	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
B12	0,0	0,44	6,0	31,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,0	1,22	6,0	30,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4,0	3,69	5,9	29,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5,5	5,32	5,7	28,35	0,14	0,00	0,00	0,00	0,36
	7,0	7,30	5,6	26,19	0,47	0,00	0,00	0,00	0,75
	10,0	9,38	4,8	21,75	1,05	0,00	0,00	0,00	1,65
	12,0	10,30	4,4	18,98	1,85	0,26	0,00	0,00	1,88
	15,0	10,55	4,4	15,25	2,55	0,48	0,00	0,09	1,73
	19,0	10,96	4,3	11,59	3,55	0,64	0,00	0,25	1,69
	21,6	11,86	4,3	11,11	3,69	0,58	0,00	0,38	1,49
	24,5	10,77	4,3	10,92	3,76	0,42	0,00	0,48	1,30
B13	0,0	0,37	6,5	30,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,0	1,15	6,4	29,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4,0	3,08	6,2	28,54	0,00	0,00	0,00	0,24	0,00
	6,0	4,87	6,0	26,46	0,21	0,00	0,00	0,23	0,77
	8,5	7,33	5,7	21,89	1,02	0,00	0,00	0,00	1,83
	12,5	9,56	5,5	17,33	2,30	0,00	0,74	0,00	2,56
	15,0	9,87	5,3	14,75	3,41	0,00	0,93	0,00	2,89
	20,5	10,35	5,1	7,38	4,80	0,24	0,63	0,00	2,79
	23,0	10,86	5,0	4,80	5,10	0,28	0,44	0,00	2,58

[Continuación] Tabla II.3 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el estudio de la influencia del pH (B11 a B14).

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
B14	0,0	0,28	7,0	30,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,0	0,87	6,8	28,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4,0	2,88	6,5	26,38	0,00	0,00	0,37	0,14	0,13
	6,0	5,14	6,0	24,55	0,00	0,00	0,56	0,24	0,38
	8,0	6,58	5,8	21,18	0,47	0,00	0,70	0,22	0,65
	10,0	7,68	5,7	17,99	1,47	0,00	0,83	0,23	0,73
	12,0	9,06	5,6	16,33	2,26	0,11	0,82	0,17	0,62
	18,0	10,94	5,4	8,01	4,69	0,22	0,42	0,18	0,90
	20,0	11,06	5,3	6,41	5,08	0,26	0,24	0,23	0,92
	22,2	12,23	5,1	4,58	5,87	0,33	0,09	0,25	0,96
	25,0	12,02	5,1	2,61	5,95	0,57	0,00	0,37	0,96

Tabla II.4 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en para la estrategia de pH desarrollada (experimento B15).

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
B15	0,0	0,34	6,9	29,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,0	1,27	6,7	29,12	0,00	0,00	0,00	0,26	0,00
	4,0	4,66	6,6	29,00	0,00	0,00	0,00	0,28	0,00
	6,0	8,60	6,3	19,73	0,00	0,00	0,67	0,44	0,22
	10,0	11,82	5,8	17,34	0,90	0,00	0,78	0,30	0,85
	12,0	12,25	5,7	17,00	2,11	0,00	0,33	0,54	0,37
	17,5	12,93	5,5	6,05	5,28	0,24	4,25	0,22	1,72
	20,0	13,04	5,5	2,58	6,31	0,38	3,39	0,38	1,84
	22,5	13,93	5,5	0,69	6,51	0,66	2,16	0,71	1,85
	24,0	14,26	5,5	0,13	6,54	0,82	0,73	0,92	1,53

Tabla II.5 Resultados experimentales obtenidos en los experimentos realizados a diferentes velocidades de agitación (N1 a N8).

EXPERIMENTO	t	C _x	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
N1	0	0,20	6,9	42,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	0,87	6,8	37,47	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
	4	2,26	6,6	29,51	0,019	0,00	0,07	0,08	0,75
	10	5,82	6,1	23,46	0,69	0,14	2,78	0,19	4,75
	20	7,19	5,5	11,55	2,41	0,23	4,05	0,32	5,58
	23	7,31	5,5	8,95	2,69	0,32	3,39	0,42	5,56
	26	7,35	5,5	7,58	3,64	0,38	3,06	0,61	5,68
	29	7,34	5,5	6,18	4,27	0,47	2,49	0,75	5,20
N2	0	0,23	6,9	34,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	0,84	6,8	32,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
	4	2,50	6,7	32,57	0,00	0,00	0,06	0,14	0,55
	10	6,68	6,1	20,86	0,65	0,15	2,45	0,24	3,80
	20	8,43	5,6	9,83	2,63	0,32	3,45	0,43	4,92
	23	8,77	5,5	7,69	3,11	0,46	2,91	0,58	4,75
	26	9,25	5,5	5,38	3,83	0,56	2,28	0,72	4,76
	29	9,75	5,5	3,50	4,44	0,47	1,77	0,79	4,83
N3	0	0,25	6,9	35,51	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00
	3	2,01	6,7	30,32	0,00	0,00	1,60	0,45	0,01
	5	4,14	6,5	28,11	0,00	0,00	2,27	0,46	1,43
	10	8,72	6,9	18,80	1,42	0,13	2,62	0,65	3,99
	12	9,34	5,8	14,22	1,93	0,15	3,04	0,67	4,02
	13	10,26	5,7	12,98	2,55	0,16	1,46	0,71	4,52
	21	12,24	5,5	2,50	5,74	1,02	0,29	0,79	4,27
	24	13,36	5,5	0,83	6,09	1,73	0,18	0,81	3,69

[Continuación] **Tabla II.5** Resultados experimentales obtenidos en los experimentos realizados a diferentes velocidades de agitación (N1 a N8).

EXPERIMENTO	t	C _x	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
N4	0	0,23	6,9	31,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	2,83	6,7	30,70	0,00	0,00	0,02	0,24	0,62
	5	5,39	6,6	25,35	0,00	0,00	0,10	0,62	1,31
	8	8,64	6,3	20,62	0,47	0,03	1,09	0,66	2,11
	10	10,10	5,8	16,34	0,90	0,09	1,48	0,67	2,65
	13	12,06	5,7	10,88	2,11	0,14	1,79	0,66	3,58
	18	14,06	5,5	1,63	5,26	1,06	1,47	0,65	3,70
	20	14,68	5,5	0,88	6,31	1,47	0,78	0,62	3,74
N5	0	0,27	6,9	33,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	3,13	6,7	30,18	0,00	0,00	0,05	0,45	0,40
	5	6,69	6,6	27,97	0,12	0,00	0,24	0,67	0,77
	8	9,62	6,1	20,56	0,60	0,08	1,03	0,72	1,88
	10	10,94	5,9	16,61	1,49	0,11	1,35	0,73	2,47
	13	13,39	5,8	11,90	3,21	0,13	1,46	0,76	3,02
	18	15,88	5,5	1,11	5,85	0,25	0,78	0,76	3,33
N6	0	0,26	6,8	34,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	2,26	6,8	32,88	0,00	0,00	0,04	0,37	0,25
	5	6,12	6,6	27,94	0,00	0,00	0,12	0,49	0,66
	10	12,49	5,9	16,05	1,45	0,12	0,90	0,57	1,41
	12	13,15	5,8	13,19	1,82	0,25	0,96	0,60	1,68
	13	15,69	5,8	10,23	2,54	0,73	0,85	0,55	1,74
	21	19,27	5,5	0,64	4,22	2,30	0,29	0,16	1,46
	24	19,81	5,5	0,07	4,91	2,80	0,15	0,07	1,18

[Continuación] **Tabla II.5** Resultados experimentales obtenidos en los experimentos realizados a diferentes velocidades de agitación (N1 a N8).

EXPERIMENTO	t	C _x	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
N7	0	0,24	6,8	27,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	1,72	6,8	26,71	0,00	0,00	0,00	0,42	0,09
	4	6,76	6,6	24,55	0,00	0,00	0,03	0,51	0,19
	6	12,69	5,9	19,66	0,09	0,00	0,05	0,64	0,22
	12	19,36	5,8	11,91	0,43	0,18	0,05	0,85	0,24
	21	23,74	5,8	4,10	0,98	0,82	0,03	0,14	0,13
	22	24,19	5,5	2,47	1,18	0,65	0,03	0,09	0,08
	24	24,38	5,5	0,70	1,14	0,59	0,02	0,08	0,00
N8	0	0,23	6,8	28,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	1,72	6,8	27,86	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00
	4	6,78	6,6	25,77	0,00	0,00	0,02	0,29	0,04
	6	13,84	5,9	20,46	0,00	0,00	0,02	0,29	0,10
	12	20,63	5,8	11,19	0,00	0,00	0,03	0,26	0,12
	21	24,05	5,8	3,39	1,17	0,11	0,03	0,09	0,09
	22	24,20	5,5	1,69	1,24	0,11	0,02	0,05	0,07
	24	24,42	5,5	0,17	1,19	0,04	0,02	0,04	0,00

Tabla II.6 Evolución de la concentración de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo (C_{O_2}) y los moles de dióxido de carbono registrados puntualmente a cada tiempo de experimentación, en las fermentaciones realizadas a distintas velocidad de agitación (N1 a N8).

t (h)	N1		N2		N3		N4	
	100 rpm		175 rpm		250 rpm		325 rpm	
	C_{O_2} (mol $_{O_2}$ /L)	n_{CO_2} (mol $_{CO_2}$)	C_{O_2} (mol $_{O_2}$ /L)	n_{CO_2} (mol $_{CO_2}$)	C_{O_2} (mol $_{O_2}$ /L)	n_{CO_2} (mol $_{CO_2}$)	C_{O_2} (mol $_{O_2}$ /L)	n_{CO_2} (mol $_{CO_2}$)
0,0	2,27E-04	0,00	2,27E-04	0,00	2,27E-04	0,00	2,27E-04	0,00
0,5	1,49E-04	0,00	1,67E-04	0,00	1,75E-04	0,00	1,74E-04	0,00
1,0	1,23E-04	0,00	1,49E-04	0,00	1,65E-04	0,00	1,64E-04	0,00
1,5	8,69E-05	0,00	1,06E-04	0,00	1,39E-04	0,00	1,40E-04	0,00
2,0	5,99E-05	0,01	7,60E-05	0,00	1,05E-04	0,01	1,14E-04	0,01
2,5	2,43E-05	0,01	4,22E-05	0,01	6,51E-05	0,01	9,44E-05	0,01
3,0	0,00E+00	0,01	1,66E-05	0,01	2,68E-05	0,01	6,11E-05	0,02
3,5	0,00E+00	0,01	9,08E-07	0,01	1,18E-05	0,02	5,29E-05	0,02
4,0	0,00E+00	0,02	0,00E+00	0,01	0,00E+00	0,02	1,86E-05	0,03
4,5	0,00E+00	0,02	0,00E+00	0,02	0,00E+00	0,03	6,58E-06	0,04
5,0	0,00E+00	0,03	0,00E+00	0,02	0,00E+00	0,04	0,00E+00	0,05
5,5	0,00E+00	0,04	0,00E+00	0,03	0,00E+00	0,05	0,00E+00	0,06
6,0	0,00E+00	0,05	0,00E+00	0,04	0,00E+00	0,06	0,00E+00	0,07
6,5	0,00E+00	0,06	0,00E+00	0,04	0,00E+00	0,07	0,00E+00	0,08
7,0	0,00E+00	0,07	0,00E+00	0,05	0,00E+00	0,08	0,00E+00	0,09
7,5	0,00E+00	0,08	0,00E+00	0,06	0,00E+00	0,09	0,00E+00	0,10
8,0	0,00E+00	0,09	0,00E+00	0,07	0,00E+00	0,10	0,00E+00	0,12
8,5	0,00E+00	0,10	0,00E+00	0,08	0,00E+00	0,12	0,00E+00	0,13
9,0	0,00E+00	0,11	0,00E+00	0,09	0,00E+00	0,13	0,00E+00	0,14
9,5	0,00E+00	0,12	0,00E+00	0,10	0,00E+00	0,14	0,00E+00	0,16
10,0	0,00E+00	0,13	0,00E+00	0,11	0,00E+00	0,15	0,00E+00	0,17
11,0	0,00E+00	0,15	0,00E+00	0,13	0,00E+00	0,17	0,00E+00	0,20
12,0	0,00E+00	0,16	0,00E+00	0,14	0,00E+00	0,19	0,00E+00	0,23
13,0	0,00E+00	0,18	0,00E+00	0,16	0,00E+00	0,22	0,00E+00	0,26
14,0	0,00E+00	0,20	0,00E+00	0,18	0,00E+00	0,23	0,00E+00	0,29
15,0	0,00E+00	0,21	0,00E+00	0,19	0,00E+00	0,26	0,00E+00	0,32
16,0	0,00E+00	0,23	0,00E+00	0,21	0,00E+00	0,28	0,00E+00	0,35
17,0	0,00E+00	0,25	0,00E+00	0,23	0,00E+00	0,31	0,00E+00	0,38
18,0	0,00E+00	0,26	0,00E+00	0,24	0,00E+00	0,33	0,00E+00	0,41
19,0	0,00E+00	0,27	0,00E+00	0,26	0,00E+00	0,36	0,00E+00	0,43
20,0	0,00E+00	0,29	0,00E+00	0,27	0,00E+00	0,38	0,00E+00	0,46
21,0	0,00E+00	0,30	0,00E+00	0,29	0,00E+00	0,40	-	-
22,0	0,00E+00	0,31	0,00E+00	0,30	0,00E+00	0,42	-	-
23,0	0,00E+00	0,33	0,00E+00	0,32	0,00E+00	0,45	-	-
24,0	0,00E+00	0,34	0,00E+00	0,34	0,00E+00	0,47	-	-
25,0	0,00E+00	0,36	0,00E+00	0,35	-	-	-	-
26,0	0,00E+00	0,37	0,00E+00	0,37	-	-	-	-
27,0	0,00E+00	0,38	0,00E+00	0,38	-	-	-	-
28,0	0,00E+00	0,40	0,00E+00	0,40	-	-	-	-
29,0	0,00E+00	0,41	0,00E+00	0,41	-	-	-	-

[Continuación] **Tabla II.6** Evolución de la concentración de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo (C_{O_2}) y los moles de dióxido de carbono registrados puntualmente a cada tiempo de experimentación, en las fermentaciones realizadas a distintas velocidad de agitación (N1 a N8).

N5			N6		N7		N8	
400 rpm			475 rpm		550 rpm		625 rpm	
t	C_{O_2}	n_{CO_2}	C_{O_2}	n_{CO_2}	C_{O_2}	n_{CO_2}	C_{O_2}	n_{CO_2}
(h)	(mol $_{O_2}$ /L)	(mol $_{CO_2}$)	(mol $_{O_2}$ /L)	(mol $_{CO_2}$)	(mol $_{O_2}$ /L)	(mol $_{CO_2}$)	(mol $_{O_2}$ /L)	(mol $_{CO_2}$)
0,0	2,27E-04	0,00	2,27E-04	0,00	2,27E-04	0,00	2,27E-04	0,00
0,5	2,09E-04	0,00	1,94E-04	0,00	2,21E-04	0,00	2,22E-04	0,00
1,0	2,05E-04	0,00	1,83E-04	0,00	2,16E-04	0,00	2,18E-04	0,00
1,5	1,73E-04	0,00	1,64E-04	0,00	2,10E-04	0,01	2,16E-04	0,01
2,0	1,43E-04	0,01	1,60E-04	0,01	1,95E-04	0,01	2,10E-04	0,01
2,5	1,13E-04	0,01	1,41E-04	0,01	1,80E-04	0,02	2,02E-04	0,02
3,0	7,95E-05	0,02	1,14E-04	0,02	1,62E-04	0,02	1,91E-04	0,02
3,5	6,42E-05	0,02	3,11E-05	0,02	1,56E-04	0,03	1,88E-04	0,03
4,0	5,77E-05	0,03	1,66E-05	0,03	1,36E-04	0,05	1,78E-04	0,05
4,5	3,31E-05	0,04	7,72E-06	0,04	9,81E-05	0,06	1,59E-04	0,06
5,0	2,29E-05	0,06	1,59E-06	0,06	5,20E-05	0,08	1,35E-04	0,08
5,5	1,48E-05	0,07	0,00E+00	0,07	2,58E-05	0,11	1,23E-04	0,11
6,0	1,36E-06	0,08	0,00E+00	0,08	1,16E-05	0,13	1,14E-04	0,13
6,5	0,00E+00	0,09	0,00E+00	0,10	0,00E+00	0,16	9,49E-05	0,16
7,0	0,00E+00	0,10	0,00E+00	0,11	0,00E+00	0,18	4,77E-05	0,18
7,5	0,00E+00	0,12	0,00E+00	0,12	0,00E+00	0,19	5,45E-06	0,19
8,0	0,00E+00	0,13	0,00E+00	0,14	0,00E+00	0,21	0,00E+00	0,21
8,5	0,00E+00	0,14	0,00E+00	0,15	0,00E+00	0,22	6,13E-06	0,22
9,0	0,00E+00	0,16	0,00E+00	0,17	0,00E+00	0,24	3,75E-05	0,24
9,5	0,00E+00	0,17	0,00E+00	0,18	0,00E+00	0,25	5,68E-05	0,25
10,0	0,00E+00	0,19	0,00E+00	0,20	1,45E-05	0,26	6,76E-05	0,26
11,0	0,00E+00	0,22	0,00E+00	0,23	3,50E-05	0,29	8,31E-05	0,29
12,0	0,00E+00	0,25	0,00E+00	0,26	4,84E-05	0,31	9,10E-05	0,31
13,0	0,00E+00	0,28	0,00E+00	0,30	5,24E-05	0,33	1,00E-04	0,33
14,0	0,00E+00	0,31	0,00E+00	0,34	5,70E-05	0,35	1,00E-04	0,35
15,0	0,00E+00	0,35	0,00E+00	0,39	6,08E-05	0,38	1,00E-04	0,38
16,0	0,00E+00	0,38	0,00E+00	0,42	6,08E-05	0,40	1,00E-04	0,40
17,0	0,00E+00	0,42	0,00E+00	0,45	6,08E-05	0,43	1,00E-04	0,43
18,0	0,00E+00	0,45	0,00E+00	0,47	6,08E-05	0,45	1,00E-04	0,45
19,0	-	-	0,00E+00	0,49	6,08E-05	0,48	1,00E-04	0,48
20,0	-	-	0,00E+00	0,51	6,08E-05	0,50	1,00E-04	0,50
21,0	-	-	0,00E+00	0,52	6,08E-05	0,53	1,00E-04	0,53
22,0	-	-	1,18E-05	0,54	6,08E-05	0,55	1,00E-04	0,55
23,0	-	-	6,51E-05	0,55	6,08E-05	0,57	1,00E-04	0,57
24,0	-	-	1,24E-04	0,55	6,08E-05	0,59	1,00E-04	0,59

Tabla II.7 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en ellos experimentos de distinta concentración inicial de glicerina en batch (G1 a G6).

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
G1	0	0,28	6,9	30,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,87	6,8	28,54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	2,88	6,5	26,37	0,00	0,00	0,36	0,14	0,12
	6	5,14	6,0	24,54	0,00	0,00	0,56	0,23	0,37
	8	6,58	5,8	21,17	0,46	0,00	0,69	0,21	0,64
	10	7,68	5,9	17,98	1,47	0,00	0,83	0,23	0,73
	12	9,05	5,6	16,33	2,26	0,11	0,82	0,17	0,62
	18	10,94	5,5	8,00	4,68	0,22	0,42	0,17	0,89
	20	11,06	5,5	6,41	5,08	0,25	0,23	0,22	0,91
	22	11,22	5,5	4,58	5,86	0,33	0,08	0,24	0,95
	25	11,02	5,5	2,60	5,95	0,57	0,00	0,37	0,95
G2	0	0,35	6,9	82,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	1,98	6,8	82,70	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00
	7	5,51	6,4	81,20	0,00	0,00	0,00	1,00	0,46
	19	10,07	5,6	62,29	3,64	0,00	1,22	0,39	1,79
	24	10,40	5,5	56,30	5,80	0,00	1,32	0,36	1,96
	31	10,98	5,5	48,53	8,53	0,18	1,11	0,44	1,80
	43	11,71	5,5	33,33	13,69	0,32	1,64	0,28	2,75
	50	11,66	5,5	23,61	16,80	0,50	1,51	0,26	3,01
	55	12,96	5,5	16,81	18,88	0,89	1,42	0,28	3,13
	67	12,54	5,5	2,27	22,01	1,60	0,00	0,65	2,94

[Continuación] **Tabla II.7** Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en ellos experimentos de distinta concentración inicial de glicerina en batch (G1 a G6).

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
G3	0	0,36	6,9	110,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	1,96	6,7	111,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	7	4,01	6,4	112,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55
	19	8,16	5,5	92,47	3,00	0,00	1,20	0,00	2,61
	24	8,50	5,5	88,55	5,15	0,00	1,21	0,00	2,97
	31	9,52	5,5	77,94	7,72	0,21	1,20	0,00	3,05
	43	11,08	5,5	62,11	12,41	0,30	1,37	0,00	2,91
	50	11,40	5,5	54,23	15,42	0,45	1,31	0,00	2,81
	55	12,15	5,5	49,07	18,01	0,49	1,34	0,00	2,84
	67	12,73	5,5	33,22	23,09	0,67	1,28	0,00	2,77
	74	13,43	5,5	23,42	26,71	0,57	1,20	0,00	2,86
	78	13,57	5,5	18,02	28,36	0,74	1,57	0,13	2,93
	88	13,50	5,5	4,51	32,39	1,43	0,00	0,37	2,82
	92	13,84	5,5	0,00	33,11	3,35	0,00	0,52	2,41
G4	0,0	0,30	6,9	142,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,5	1,57	6,8	142,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	8,0	4,36	6,5	140,61	0,00	0,00	0,00	1,54	0,00
	12,2	5,77	5,9	138,16	0,35	0,00	0,86	1,94	0,80
	25,2	8,57	5,6	124,38	4,87	0,00	1,00	1,21	1,22
	35,5	10,02	5,5	114,35	8,59	0,27	0,79	1,03	1,31
	49,0	10,86	5,5	98,92	14,53	0,29	1,52	0,86	1,35
	54,6	10,94	5,5	93,79	17,41	0,47	1,00	0,00	1,31
	72,0	11,86	5,5	76,86	25,93	0,77	0,00	0,71	1,26
	97,0	12,73	5,5	44,56	39,21	1,14	0,00	0,27	1,32
	127,6	12,40	5,5	12,43	49,42	4,45	0,00	0,77	0,88

[Continuación] **Tabla II.7** Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en ellos experimentos de distinta concentración inicial de glicerina en batch (G1 a G6).

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
G5	0,0	0,28	6,9	194,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,0	0,55	6,8	193,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	6,2	1,64	6,8	194,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	20,0	6,41	5,7	191,43	0,60	0,00	0,00	0,00	0,69
	28,1	7,49	5,8	184,52	2,88	0,00	0,00	0,00	0,83
	74,4	8,67	5,5	156,56	17,91	1,10	0,00	0,52	0,34
	92,4	8,74	5,5	139,26	24,21	1,65	0,00	0,54	0,00
	98,8	8,16	5,5	136,52	26,03	1,72	0,00	0,70	0,00
	116,2	8,73	5,5	134,81	28,89	1,63	0,00	0,69	0,00
	128,2	9,13	5,5	135,58	29,85	1,59	0,00	0,93	0,00
G6	0,0	0,28	6,9	211,54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,5	0,88	6,8	212,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	8,0	2,02	6,7	210,47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	12,2	4,36	6,5	211,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	25,2	6,72	5,7	205,00	2,04	0,20	0,00	0,00	0,00
	35,5	7,90	5,5	197,25	5,48	0,51	0,00	0,00	0,00
	49,0	9,93	5,5	184,49	9,25	0,84	0,00	0,00	0,00
	54,6	9,90	5,5	182,07	10,90	1,04	0,00	0,00	0,00
	72,0	10,47	5,5	177,97	15,51	1,61	0,00	0,00	0,00
	97,0	11,29	5,5	169,58	20,08	1,74	0,00	0,00	0,00
	127,6	11,77	5,5	174,55	21,79	1,89	0,00	0,00	0,00

Tabla II.8 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el experimento G7.

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
G7	0,0	0,25	7,0	105,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,8	1,25	6,8	101,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5,5	4,18	6,7	100,47	0,00	0,00	0,00	0,42	0,00
	17,2	9,80	5,6	87,44	3,37	0,12	3,76	0,39	1,71
	20,0	11,61	5,5	82,42	5,13	0,22	3,14	0,47	1,81
	24,6	12,43	5,5	78,31	7,85	0,20	2,35	0,57	2,10
	28,6	13,26	5,5	73,82	10,25	0,25	1,90	0,58	2,25
	42,3	14,44	5,5	54,65	17,97	0,26	1,07	0,42	2,48
	45,7	15,94	5,5	50,95	20,64	0,22	0,85	0,43	2,57
	48,3	17,18	5,5	48,45	22,06	0,34	0,64	0,41	2,61
	49,0	15,48	5,5	107,90	19,60	0,31	0,73	0,71	2,32
	72,0	15,52	5,5	72,65	33,65	0,86	0,75	0,84	1,74
	98,6	15,62	5,5	55,34	51,21	1,34	0,79	0,12	1,48
	113,8	16,85	5,5	37,83	61,25	2,11	0,00	0,24	1,47
	120,3	17,38	5,5	30,57	66,19	3,15	0,00	0,31	1,42
	121,0	15,55	5,5	96,71	67,30	2,67	0,00	0,55	1,22
	137,0	15,49	5,5	76,54	75,68	2,27	0,56	0,44	1,21
	140,9	15,57	5,5	72,71	83,10	2,61	0,41	0,43	1,21
	161,9	17,79	5,5	56,01	90,33	4,69	0,00	0,55	0,93
	169,5	17,85	5,5	47,88	92,21	5,49	0,00	0,72	0,75
	185,6	17,96	5,5	36,15	93,18	6,65	0,00	1,14	0,46
	192,0	17,89	5,5	32,68	93,25	8,3	0,00	1,23	0,26

Tabla II.9 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el experimento G8.

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
G8	0,0	0,29	7,0	48,81	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,0	1,08	7,0	38,81	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00
	4,0	3,52	6,8	37,05	0,00	0,00	0,00	0,54	0,00
	9,0	8,07	5,9	25,73	0,96	0,00	3,06	0,62	1,32
	11,0	9,02	5,9	20,89	2,22	0,00	4,24	0,38	1,80
	12,0	9,52	5,8	17,57	2,61	0,00	4,12	0,31	2,23
	12,0	8,97	5,6	115,47	2,48	0,00	3,32	0,49	2,10
	19,5	9,47	5,5	110,83	5,09	0,00	8,32	0,00	2,39
	21,5	9,35	5,5	105,23	6,44	0,27	9,50	0,00	2,44
	23,0	10,14	5,5	101,39	10,12	0,59	10,65	0,40	2,22
	35,0	9,81	5,5	93,18	11,38	0,67	10,42	0,41	2,28
	47,5	10,24	5,5	80,25	18,88	1,11	9,97	0,33	2,39
	50,5	9,91	5,5	73,89	19,67	1,17	9,55	0,36	2,31
	58,2	10,74	5,5	66,99	25,56	1,47	9,77	0,52	2,48
	68,2	11,84	5,5	46,78	31,18	1,58	8,23	0,67	2,61
	75,1	12,16	5,5	36,89	36,23	1,41	8,34	0,58	2,87
	78,0	12,79	5,5	31,87	38,82	1,45	8,47	0,57	3,01
	78,0	11,63	5,5	136,92	35,84	1,36	6,07	0,96	2,80
	96,0	11,75	5,5	115,69	42,69	1,96	7,98	0,82	1,96
	124,0	11,90	5,5	90,85	66,30	2,71	9,12	0,77	1,69
	143,2	12,58	5,5	58,63	76,53	3,60	4,70	1,19	1,40
	146,5	12,70	5,5	54,09	78,43	3,85	4,29	1,24	1,38
	150,0	13,40	5,5	49,54	79,99	4,45	3,80	1,17	1,34
	164,0	13,79	5,5	31,94	82,20	6,58	0,00	1,19	1,12
	168,5	14,21	5,5	29,74	83,72	7,40	0,00	1,30	0,98
	171,6	13,53	5,5	27,42	83,49	7,82	0,00	1,44	0,87
	177,1	13,95	5,5	25,45	84,76	8,49	0,00	1,63	0,69

Tabla II.10 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el experimento G9.

EXPERIMENTO	t	C _x	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
G9	0,0	0,25	6,9	67,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	17,7	10,87	5,7	38,01	1,48	0,00	0,73	0,22	1,08
	20,6	12,04	5,6	33,58	6,91	0,05	1,58	0,77	3,37
	22,3	12,09	5,6	31,15	7,69	0,28	1,23	0,75	3,46
	24,0	12,61	5,6	28,83	8,80	0,12	1,00	0,77	3,59
	24,4	11,55	5,5	56,50	8,26	0,25	1,02	0,53	3,50
	26,0	13,49	5,5	54,51	8,95	0,27	1,95	0,27	3,80
	29,1	13,02	5,5	49,73	10,53	0,36	2,83	0,16	4,08
	40,5	13,73	5,5	35,31	17,57	0,56	2,42	0,19	3,91
	43,3	13,77	5,5	31,49	19,58	0,62	2,24	0,21	3,89
	46,9	13,73	5,5	27,88	22,50	0,92	1,67	0,29	3,81
	48,1	13,30	5,5	25,77	22,58	0,62	2,01	0,23	3,95
	48,3	15,11	5,5	56,08	20,36	0,45	2,09	0,17	3,73
	50,5	12,41	5,5	54,32	21,37	0,46	2,77	0,00	3,64
	53,0	12,65	5,5	51,01	22,85	0,43	2,92	0,00	3,54
	65,0	12,64	5,5	36,01	30,84	0,76	2,28	0,15	3,02
	67,0	12,44	5,5	33,48	32,28	0,85	2,11	0,14	2,94
	69,2	12,79	5,5	30,42	33,71	0,86	1,99	0,21	2,92
	72,0	12,92	5,5	26,79	35,62	0,98	1,71	0,24	2,93
	72,5	12,05	5,5	56,99	32,42	0,79	1,78	0,13	2,68
	74,3	12,74	5,5	54,71	33,85	0,55	2,55	0,13	2,79
	89,9	12,52	5,5	35,64	43,99	1,16	1,91	0,24	2,46
	92,3	12,97	5,5	32,44	45,76	1,34	1,69	0,28	2,36
	96,0	13,28	5,5	27,60	48,36	1,54	1,10	0,34	2,50
	96,4	12,13	5,5	59,07	45,43	1,61	1,02	0,23	2,23
	108,0	13,65	5,5	44,68	52,21	2,23	0,00	0,38	2,36
	120,1	15,22	5,5	29,23	58,66	3,73	0,00	0,52	2,18

[Continuación] **Tabla II.10** Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el experimento G9.

EXPERIMENTO	t	C _x	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
G9	120,7	12,91	5,5	60,56	55,13	3,43	0,00	0,42	1,95
	132,0	15,68	5,5	43,69	65,63	4,87	0,00	0,75	0,96
	147,0	16,54	5,5	28,20	73,96	4,80	0,00	1,26	0,62
	168,0	14,11	5,5	6,32	87,67	3,89	0,00	1,76	0,45
	172,0	14,92	5,5	1,50	90,02	6,12	0,00	2,27	0,13
	175,0	15,01	5,5	0,00	90,50	7,21	0,00	2,25	0,00

Tabla II.11 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el experimento C1.

EXPERIMENTO	t	C _x	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
C1	0,0	0,345	6,9	75,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,0	0,852	6,8	75,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	9,2	7,891	6,1	68,22	0,00	0,00	3,46	0,00	0,00
	12,0	9,802	5,8	69,07	3,08	0,00	5,96	0,00	2,53
	14,0	10,961	5,6	54,76	2,60	0,00	5,77	0,00	2,22
	19,0	12,167	5,5	51,30	4,88	0,00	6,32	0,00	4,90
	23,0	12,516	5,5	49,68	8,36	0,85	5,68	0,00	5,10
	33,0	14,363	5,5	36,63	13,73	0,59	4,42	0,00	4,15
	44,0	17,089	5,5	23,81	20,05	0,90	3,70	0,00	4,77
	50,5	17,875	5,5	14,62	22,85	1,25	2,97	0,00	5,98
	52,0	18,768	5,5	12,22	24,59	1,42	2,75	0,00	5,76
	60,0	17,303	5,5	5,87	26,20	1,34	4,90	0,00	4,89
	72,0	17,618	5,5	0,00	30,17	6,15	1,09	0,00	3,60

Tabla II.12 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el experimento C2.

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
C2	0,0	0,43	6,8	128,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,0	0,58	6,8	127,00	0,00	0,00	1,44	0,00	0,00
	9,2	3,98	6,7	121,80	0,00	0,00	1,47	0,00	0,00
	12,0	5,32	6,6	118,20	0,00	0,00	1,69	0,00	0,00
	14,0	6,03	6,4	115,00	0,00	0,00	2,64	0,00	0,00
	19,0	7,03	6,2	111,90	0,00	0,00	2,78	0,00	0,00
	23,0	8,59	6,0	108,60	2,89	0,00	3,42	0,00	0,00
	33,0	13,00	6,0	100,40	9,60	0,00	3,34	0,00	0,00
	44,0	16,68	6,0	90,20	16,50	0,00	3,57	0,00	8,08
	50,5	16,76	5,8	82,50	18,05	0,00	4,89	0,00	7,54
	52,0	16,52	5,5	82,40	19,20	0,00	5,01	0,00	5,90
	75,0	16,52	5,5	60,20	27,20	0,00	3,67	0,00	4,38
	79,0	16,82	5,5	53,80	29,90	0,38	3,54	0,00	3,23
	80,0	16,24	5,5	53,10	30,20	0,42	2,65	0,00	3,25
	92,0	16,78	5,5	40,20	35,88	0,43	0,00	0,00	0,00
	96,0	17,49	5,5	38,80	38,54	0,54	0,00	0,00	0,00
	100,0	17,01	5,5	36,70	40,75	0,63	0,00	0,00	0,00
	120,0	17,38	5,5	15,10	46,24	1,25	0,00	0,00	0,00
	124,0	16,87	5,5	8,50	47,92	2,37	0,00	0,00	0,00
	130,0	16,34	5,5	1,90	49,23	3,42	0,00	0,00	0,00
	136,0	16,03	5,5	0,00	50,14	5,60	0,00	0,00	0,00

Tabla II.13 Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el experimento C3.

EXPERIMENTO	t	C _X	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
C3	0,0	0,29	6,9	62,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,0	0,66	6,8	57,82	0,00	0,00	1,44	0,00	0,00
	7,0	5,84	6,1	52,23	0,00	0,00	1,47	0,00	0,00
	11,0	8,82	5,8	48,22	2,89	0,14	1,69	0,00	1,24
	21,0	12,35	5,5	36,92	6,69	0,24	2,20	0,00	1,85
	24,0	12,54	5,5	34,32	8,52	0,26	2,32	0,00	2,65
	24,2	11,87	5,5	58,32	7,98	0,33	2,85	0,00	3,10
	27,0	13,01	5,5	56,98	9,01	0,38	2,78	0,00	4,40
	40,0	13,56	5,5	44,24	13,65	0,58	2,12	0,00	5,52
	44,5	13,27	5,5	37,54	15,93	0,65	1,87	0,00	5,97
	48,0	13,36	5,5	34,56	17,68	1,14	1,20	0,00	5,02
	48,1	13,25	5,5	57,32	15,87	0,68	0,00	0,00	4,78
	52,3	13,52	5,5	53,25	16,73	0,54	0,00	0,00	4,34
	60,0	13,76	5,5	45,35	19,43	0,55	0,00	0,00	3,89
	72,0	13,89	5,5	31,88	25,43	0,84	0,00	0,00	3,34
	72,2	13,32	5,5	60,85	24,53	0,75	0,00	0,00	3,56
	76,0	13,54	5,5	56,67	25,75	0,94	0,00	0,00	3,54
	78,5	13,52	5,5	54,26	27,24	0,95	0,00	0,00	3,27
	90,0	13,76	5,5	44,64	31,98	1,15	0,00	0,00	3,14
	96,0	12,99	5,5	38,04	33,54	1,35	0,00	0,00	3,24
	96,1	12,77	5,5	62,93	31,25	0,97	0,00	0,00	3,08
	110,0	12,85	5,5	51,54	38,31	1,28	0,00	0,00	3,05
	118,5	13,02	5,5	43,04	44,32	1,47	0,00	0,00	2,56
	124,0	13,45	5,5	38,92	47,07	1,84	0,00	0,00	2,67
	124,2	13,32	5,5	58,12	46,43	1,77	0,00	0,00	2,46
	132,0	13,14	5,5	52,34	48,64	2,45	0,00	0,00	2,30
	140,0	13,54	5,5	45,32	53,56	3,77	0,00	0,00	2,05

[Continuación] **Tabla II.13** Resultados obtenidos en la evolución de la concentración de biomasa, pH, concentración de glicerina y concentración de los distintos productos metabólicos en el experimento C3.

EXPERIMENTO	t	C _x	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
C3	160,0	13,67	5,5	22,43	62,65	4,62	0,00	0,00	2,05
	168,0	13,25	5,5	17,32	65,65	5,36	0,00	0,00	1,89
	180,0	13,65	5,5	9,54	73,02	5,77	0,00	0,00	1,34
	186,0	13,65	5,5	6,83	76,02	4,28	0,00	0,00	0,76
	190,0	13,65	5,5	3,65	77,42	6,73	0,00	0,00	0,32
	200,0	13,55	5,5	0,00	80,54	10,83	0,00	0,00	0,35

ANEXO III. RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL CAPÍTULO 5

Tabla III.1 Resultados experimentales obtenidos en los experimentos realizados a diferentes velocidades de agitación (N1 a N8).

EXPERIMENTO	t	C _x	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
N1	0	0,20	6,9	42,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	0,87	6,8	37,47	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
	4	2,26	6,6	29,51	0,019	0,00	0,07	0,08	0,75
	10	5,82	6,1	23,46	0,69	0,14	2,78	0,19	4,75
	20	7,19	5,5	11,55	2,41	0,23	4,05	0,32	5,58
	23	7,31	5,5	8,95	2,69	0,32	3,39	0,42	5,56
	26	7,35	5,5	7,58	3,64	0,38	3,06	0,61	5,68
	29	7,34	5,5	6,18	4,27	0,47	2,49	0,75	5,20
N2	0	0,23	6,9	34,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	0,84	6,8	32,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
	4	2,50	6,7	32,57	0,00	0,00	0,06	0,14	0,55
	10	6,68	6,1	20,86	0,65	0,15	2,45	0,24	3,80
	20	8,43	5,6	9,83	2,63	0,32	3,45	0,43	4,92
	23	8,77	5,5	7,69	3,11	0,46	2,91	0,58	4,75
	26	9,25	5,5	5,38	3,83	0,56	2,28	0,72	4,76
	29	9,75	5,5	3,50	4,44	0,47	1,77	0,79	4,83
N3	0	0,25	6,9	35,51	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00
	3	2,01	6,7	30,32	0,00	0,00	1,60	0,45	0,01
	5	4,14	6,5	28,11	0,00	0,00	2,27	0,46	1,43
	10	8,72	6,9	18,80	1,42	0,13	2,62	0,65	3,99
	12	9,34	5,8	14,22	1,93	0,15	3,04	0,67	4,02
	13	10,26	5,7	12,98	2,55	0,16	1,46	0,71	4,52
	21	12,24	5,5	2,50	5,74	1,02	0,29	0,79	4,27
	24	13,36	5,5	0,83	6,09	1,73	0,18	0,81	3,69

[Continuación] **Tabla III.1** Resultados experimentales obtenidos en los experimentos realizados a diferentes velocidades de agitación (N1 a N8).

EXPERIMENTO	t	C _x	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
N4	0	0,23	6,9	31,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	2,83	6,7	30,70	0,00	0,00	0,02	0,24	0,62
	5	5,39	6,6	25,35	0,00	0,00	0,10	0,62	1,31
	8	8,64	6,3	20,62	0,47	0,03	1,09	0,66	2,11
	10	10,10	5,8	16,34	0,90	0,09	1,48	0,67	2,65
	13	12,06	5,7	10,88	2,11	0,14	1,79	0,66	3,58
	18	14,06	5,5	1,63	5,26	1,06	1,47	0,65	3,70
	20	14,68	5,5	0,88	6,31	1,47	0,78	0,62	3,74
N5	0	0,27	6,9	33,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	3,13	6,7	30,18	0,00	0,00	0,05	0,45	0,40
	5	6,69	6,6	27,97	0,12	0,00	0,24	0,67	0,77
	8	9,62	6,1	20,56	0,60	0,08	1,03	0,72	1,88
	10	10,94	5,9	16,61	1,49	0,11	1,35	0,73	2,47
	13	13,39	5,8	11,90	3,21	0,13	1,46	0,76	3,02
	18	15,88	5,5	1,11	5,85	0,25	0,78	0,76	3,33
N6	0	0,26	6,8	34,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	2,26	6,8	32,88	0,00	0,00	0,04	0,37	0,25
	5	6,12	6,6	27,94	0,00	0,00	0,12	0,49	0,66
	10	12,49	5,9	16,05	1,45	0,12	0,90	0,57	1,41
	12	13,15	5,8	13,19	1,82	0,25	0,96	0,60	1,68
	13	15,69	5,8	10,23	2,54	0,73	0,85	0,55	1,74
	21	19,27	5,5	0,64	4,22	2,30	0,29	0,16	1,46
	24	19,81	5,5	0,07	4,91	2,80	0,15	0,07	1,18

[Continuación] **Tabla III.1** Resultados experimentales obtenidos en los experimentos realizados a diferentes velocidades de agitación (N1 a N8).

EXPERIMENTO	t	C _x	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _L	C _A	C _E
	(h)	(g/L)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
N7	0	0,24	6,8	27,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	1,72	6,8	26,71	0,00	0,00	0,00	0,42	0,09
	4	6,76	6,6	24,55	0,00	0,00	0,03	0,51	0,19
	6	12,69	5,9	19,66	0,09	0,00	0,05	0,64	0,22
	12	19,36	5,8	11,91	0,43	0,18	0,05	0,85	0,24
	21	23,74	5,8	4,10	0,98	0,82	0,03	0,14	0,13
	22	24,19	5,5	2,47	1,18	0,65	0,03	0,09	0,08
	24	24,38	5,5	0,70	1,14	0,59	0,02	0,08	0,00
N8	0	0,23	6,8	28,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	1,72	6,8	27,86	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00
	4	6,78	6,6	25,77	0,00	0,00	0,02	0,29	0,04
	6	13,84	5,9	20,46	0,00	0,00	0,02	0,29	0,10
	12	20,63	5,8	11,19	0,00	0,00	0,03	0,26	0,12
	21	24,05	5,8	3,39	1,17	0,11	0,03	0,09	0,09
	22	24,20	5,5	1,69	1,24	0,11	0,02	0,05	0,07
	24	24,42	5,5	0,17	1,19	0,04	0,02	0,04	0,00

Tabla III.2 Resultados experimentales obtenidos para el estudio del tiempo de almacenamiento del biocatalizador, a tiempo cero y a las 24h de fermentación (D0 a D3).

EXPERIMENTO	t	C _G	C _{2,3-BD}	C _a	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
D0	0	27,56	0,18	0,01	0,00	0,00	0,00
	24	5,82	8,20	0,35	0,41	0,00	0,00
D1	0	26,83	0,16	0,03	0,00	0,00	0,00
	24	4,84	7,82	0,40	0,00	0,10	0,00
D2	0	26,20	0,19	0,03	0,00	0,00	0,00
	24	6,32	6,26	0,86	0,00	0,00	0,00

[Continuación] **Tabla III.2** Resultados experimentales obtenidos para el estudio del tiempo de almacenamiento del biocatalizador, a tiempo cero y a las 24h de fermentación (D0 a D3).

EXPERIMENTO	t	C _G	C _{2,3-BD}	C _a	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
D3	0	25,85	0,34	0,03	0,00	0,00	0,00
	24	11,02	4,56	0,91	2,05	0,00	0,00

Tabla III.3 Resultados experimentales de los experimentos realizados con distintos tampones para el tiempo inicial y las 24h.

EXPERIMENTO	t	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
C1	0	4,8	36,82	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00
	24	4,4	31,30	1,82	0,48	0,96	0,00	0,00
C2	0	4,8	36,42	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
	24	4,8	11,76	7,78	1,23	0,79	0,00	1,42
C3	0	4,8	36,21	0,51	0,00	0,00	0,00	0,27
	24	4,8	8,19	9,00	1,68	0,40	0,00	1,88
C4	0	4,8	37,06	0,49	0,00	0,00	0,00	0,27
	24	4,8	10,45	8,48	1,60	0,40	0,00	1,85
F1	0	7,0	36,00	0,42	0,00	0,00	0,00	0,21
	24	4,5	21,82	4,51	0,52	0,00	0,00	0,74
F2	0	7,0	35,98	0,51	0,00	0,00	0,00	0,27
	24	5,2	9,21	8,52	1,07	0,00	0,00	1,51
F3	0	7,0	33,92	0,48	0,00	0,00	0,00	0,37
	24	6,1	10,70	5,12	1,37	0,56	0,00	1,56
F4	0	7,0	37,47	0,48	0,00	0,00	0,00	0,39
	24	6,5	14,52	5,14	1,27	0,84	0,00	1,58
T1	0	8,0	35,93	0,50	0,00	0,00	0,00	0,32
	24	5,0	10,35	7,11	1,31	0,57	0,00	1,83
T2	0	8,0	36,66	0,48	0,00	0,00	0,00	0,30
	24	6,0	11,59	5,54	1,89	0,36	0,00	1,66

[Continuación] **Tabla III.3** Resultados experimentales de los experimentos realizados con distintos tampones para el tiempo inicial y las 24h.

EXPERIMENTO	t	pH	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
T3	0	8,0	35,99	0,51	0,00	0,00	0,00	0,30
	24	6,3	12,42	4,03	1,86	0,54	0,00	1,38
T4	0	8,0	35,07	0,51	0,00	0,00	0,00	0,30
	24	6,5	12,98	3,31	1,66	0,79	0,00	1,34

Tabla III.4 Resultados experimentales obtenidos para el estudio de la concentración de biocatalizador (X1 a X5), a tiempo cero y a las 24h de fermentación.

EXPERIMENTO	t (h)	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
X1	0,0	41,92	0,00	0,00	0,00	0,22	0,00
	8,5	37,79	0,06	0,00	0,22	0,00	0,00
	18,5	35,99	0,12	0,22	0,00	0,00	0,00
	25,0	36,27	0,25	0,24	0,00	0,00	0,00
X2	0,0	40,09	0,00	0,00	0,00	0,45	0,00
	8,5	24,14	4,26	0,00	0,28	0,00	0,00
	18,5	20,48	2,58	1,79	0,00	0,00	0,00
	25,0	18,60	2,64	1,76	0,00	0,00	0,00
X3	0,0	37,05	0,00	0,00	0,00	0,63	0,00
	8,5	20,52	6,74	0,00	0,00	1,78	0,00
	18,5	7,69	8,51	2,06	0,76	0,00	0,00
	25,0	6,72	9,12	3,72	0,25	0,00	0,00
X4	0,0	34,52	0,00	0,00	0,00	0,94	0,00
	8,5	16,13	6,27	0,00	0,00	2,13	0,00
	18,5	0,94	10,29	1,81	0,91	0,00	0,00
X5	0,0	35,53	0,00	0,00	0,00	1,39	0,00
	8,5	17,17	5,54	0,24	0,00	2,83	0,00
	18,5	0,41	10,97	1,47	1,12	0,00	0,00

Tabla III.5 Resultados experimentales obtenidos para el estudio de la influencia de la velocidad de agitación (M1 a M4).

EXPERIMENTO	t	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E	C _{O2}
	(h)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(mol _{O2} /L)
M1	0	44,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,27·10 ⁻⁴
	6	39,25	0,31	0,30	0,00	2,57	0,50	0,00
	9	36,68	0,58	0,48	0,09	3,24	0,49	0,00
	12	34,79	0,90	0,67	0,09	3,80	0,47	0,00
	24	24,02	3,31	1,24	0,00	4,52	0,43	0,00
	30	19,87	5,02	1,38	0,00	4,25	0,52	0,00
	40	14,32	7,13	1,53	0,00	3,87	0,65	0,00
M2	0	43,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,27·10 ⁻⁴
	6	35,13	1,38	0,27	0,00	3,81	0,66	0,00
	9	31,70	2,01	0,48	0,00	4,42	0,69	0,00
	12	28,51	3,09	0,63	0,00	5,24	0,74	0,00
	24	16,76	7,88	1,21	0,09	5,97	0,89	0,00
	34	7,50	12,07	1,39	0,16	6,3	1,02	0,00
	40	2,81	14,55	1,62	0,08	5,63	1,22	0,00
M3	0	44,99	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,27·10 ⁻⁴
	3	39,65	1,35	0,00	0,00	2,61	0,66	0,00
	6	33,49	2,83	0,00	0,16	4,04	0,95	0,00
	13,5	20,74	8,25	0,16	0,3	3,73	1,45	0,00
	20	10,67	12,87	0,79	0,84	1,46	1,58	0,00
	24	4,76	16,27	1,56	1,24	0,00	1,45	0,00
	30	0,00	19,98	2,46	1,07	0,00	0,99	0,00
M4	0	43,36	0,00	0,00	0,16	0,29	0,39	2,27·10 ⁻⁴
	3	33,10	2,52	0,19	0,19	3,22	1,20	0,00
	6	25,73	4,41	0,88	0,77	0,27	1,30	0,00
	13,5	22,84	4,66	1,38	0,41	0,00	0,95	0,00
	20	20,01	4,26	1,75	0,00	0,00	0,64	0,00
	24	19,36	4,90	1,30	0,00	0,00	0,00	0,00
	30	18,41	5,12	1,53	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla III.6 Resultados experimentales obtenidos en el estudio de la influencia de la concentración inicial de glicerina (Z1 a Z5).

EXPERIMENTO	t	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
Z1	0	44,99	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	39,65	1,35	0,00	0,00	0,61	0,66
	6	33,49	2,83	0,00	0,16	2,04	0,95
	14	20,74	8,25	0,16	0,30	1,73	1,45
	20	10,67	12,87	0,79	0,84	0,00	1,58
	24	4,76	16,27	1,56	1,24	0,00	1,45
	30	0,00	19,98	1,86	1,07	0,00	0,99
Z2	0	69,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	60,85	2,94	0,00	0,00	0,93	0,34
	16	36,70	11,78	0,31	0,00	0,55	1,75
	20	29,40	15,70	0,39	0,00	0,33	2,08
	24	25,34	18,64	0,60	0,00	0,04	2,38
	29	17,10	22,23	1,06	0,44	0,00	2,58
	40	0,00	29,84	1,41	1,74	0,00	2,23
Z3	0	124,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	114,90	2,13	0,00	0,00	0,00	0,39
	16	95,15	10,11	0,53	0,00	0,00	1,27
	20	88,47	12,87	0,75	0,00	0,00	1,63
	24	81,16	16,32	0,89	0,00	0,00	1,87
	29	71,79	20,33	0,99	0,00	0,00	2,27
	40	47,41	30,33	0,94	0,00	0,00	2,99
	45	43,27	32,17	1,11	1,48	0,00	2,93
	48	37,54	35,54	1,31	1,64	0,00	2,65
	65	8,26	47,51	1,46	1,77	0,00	1,30
	72	0,00	53,02	1,59	1,81	0,00	1,09

[Continuación] **Tabla III.6** Resultados experimentales obtenidos en el estudio de la influencia de la concentración inicial de glicerina (Z1 a Z5).

EXPERIMENTO	t	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
Z4	0	211,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	201,99	3,05	0,30	0,00	0,00	0,36
	16	184,25	10,38	0,53	0,00	0,00	1,08
	20	175,82	14,03	0,65	0,00	0,00	1,35
	24	167,92	16,54	0,89	0,00	0,00	1,63
	29	160,27	20,43	0,99	0,00	0,00	1,92
	40	136,65	28,31	0,94	0,35	0,00	2,62
	45	128,59	30,99	1,11	1,14	0,00	2,60
	48	124,91	32,59	1,26	1,53	0,00	2,55
	65	93,13	45,87	1,34	1,65	0,00	2,36
	72	82,43	50,21	1,37	1,69	0,00	2,07
	96	46,43	65,20	1,60	1,78	0,00	1,30
	100	39,94	67,42	1,64	1,67	0,00	1,10
	110	26,85	72,92	1,76	1,54	0,00	0,87
	115	20,01	75,09	1,83	1,33	0,00	0,72
	120	12,86	79,15	1,93	1,29	0,00	0,48
	130	5,43	82,02	1,97	1,08	0,00	0,41
	140	0,00	80,21	2,00	0,99	0,00	0,07

[Continuación] **Tabla III.6** Resultados experimentales obtenidos en el estudio de la influencia de la concentración inicial de glicerina (Z1 a Z5).

EXPERIMENTO	t	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
Z5	0	257,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0
	5	246,14	3,60	0,00	0,00	0,00	0,89
	16	230,45	10,68	0,51	0,00	0,00	1,28
	20	220,21	15,06	0,90	0,00	0,00	2,16
	24	215,67	18,09	1,08	0,00	0,00	2,52
	29	202,43	20,67	1,25	0,00	0,00	2,76
	40	185,32	29,34	1,28	0,00	0,00	3,16
	45	177,90	33,86	1,08	1,48	0,00	3,88
	48	171,03	35,76	1,24	1,64	0,00	3,82
	65	139,28	45,23	1,50	1,71	0,00	3,71
	72	125,82	50,84	1,69	1,77	0,00	3,62
	96	84,35	64,41	1,86	1,81	0,00	2,32
	100	77,92	67,98	1,99	1,84	0,00	2,52
	110	63,15	71,04	2,05	1,90	0,00	2,35
	115	55,26	73,85	2,16	1,87	0,00	2,14
	130	37,77	77,98	2,25	1,88	0,00	1,78
	138	29,22	80,87	2,34	1,74	0,00	1,75
	142	27,22	82,75	2,38	1,69	0,00	1,68
	150	22,83	83,14	2,50	1,74	0,00	1,59
	170	21,86	85,41	2,48	1,64	0,00	1,54

Tabla III.7 Resultados experimentales obtenidos en el estudio de la influencia del empleo de glicerol crudo como sustrato carbonado (Z6).

EXPERIMENTO	t	C _G	C _{2,3-BD}	C _{ac}	C _A	C _L	C _E
	(h)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
Z6	0	202,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	193,40	2,46	0,00	0,16	0,00	0,12
	16	184,71	8,95	0,12	0,27	0,00	0,25
	20	176,30	12,63	0,22	0,39	0,00	0,36
	24	173,54	13,75	0,29	0,40	0,00	0,47
	29	155,59	18,39	0,32	0,53	0,00	0,53
	40	151,14	24,15	0,44	0,76	0,00	0,67
	45	140,43	26,54	0,53	0,96	0,00	0,84
	48	135,92	29,33	0,55	1,04	0,00	1,00
	65	118,43	41,28	0,60	1,16	0,00	0,84
	72	101,23	45,19	0,66	1,25	0,00	0,65
	96	69,43	57,15	0,84	1,02	0,00	0,44
	100	53,54	60,68	0,93	0,87	0,00	0,39
	110	42,54	65,63	1,00	0,78	0,00	0,32
	115	35,66	67,58	1,20	0,69	0,00	0,18
	120	25,53	71,24	1,23	0,58	0,00	0,16
	130	15,75	73,82	1,25	0,43	0,00	0,13
	140	8,77	75,32	1,34	0,39	0,00	0,12
	150	0,00	76,53	1,45	0,36	0,00	0,09

